DIABOLIN

Ein Faktor im Serum, der die Bildung des 3′:5′-cyclischen Adenosinmonophosphates unterdrückt

Untersuchungen zur
Isolierung und Charakterisierung

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
KONRAD WAGNER
München, 11. Nov. 1982

1983

DIABOLIN

Ein Faktor im Serum, der die Bildung des 3′:5′-cyclischen Adenosinmonophosphates unterdrückt

Untersuchungen zur
Isolierung und Charakterisierung

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
KONRAD WAGNER
München, 11. Nov. 1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Hörmann

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Februar 1983

meinen Eltern

in Dankbarkeit

gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544309_0003

I n h a l t Seite

Liste der im Text verwandten Abkürzungen i

Liste der im Text verwandten halbsystematischen, Trivial- und Handelsnamen v

Allgemeine Bemerkungen zur grafischen Darstellung von Meßdaten x

1. Einführung 1

2. Literaturstand und Problemstellung 5

3. Ergebnisse 9

3.1. Optimierung des biologischen Testsystems 9

3.1.1. Prinzip des biologischen Tests 9

3.1.2. Definition einer Einheit 10

3.1.3. Variation der Anzuchtbedingungen 13

3.1.3.1. Anzucht in serumfreiem Medium 13

3.1.3.2. Mediumzusätze als Serumersatz 16

3.1.3.3. Variation der Zelldichte 23

3.1.3.4. Änderung der Anzuchtzeit 26

3.1.4. Variation der Testbedingungen 26

3.1.4.1. Zusätze während der Zellinkubation 26

3.1.5. Zusammenfassung 28

3.2. Biologische Charakterisierung 31

3.2.1. Aufnahme bzw. Ausscheidung von Diabolin 31

3.2.2. Bindung und Aktivierung durch Proteine 34

3.2.2.1. Serumalbumin 34

3.2.2.2. Bindung an andere Proteine 40

3.2.3. Calcium-Abhängigkeit 40

3.2.4. Zusammenfassung 43

3.3. Quellenspezifität 45

3.3.1. Säugerplasmen 45

3.3.2. Vögelplasmen 46

3.3.3. Andere Körperflüssigkeiten 47

3.3.4. Zellextrakte 48

3.3.5. Zusammenfassung 51

3.4. Wirkortspezifität 53

3.5. Anreicherung 57

3.5.1. Zerstörung des Trägerproteins 57

3.5.1.1. Behandlung mit Proteinase K 57

3.5.1.2. Trennung auf einer Kieselgelsäule 64

3.5.2. Extraktion von Acetonpulver 68

3.5.2.1. Trennung auf einer Kieselgelplatte 68

3.5.2.2. Direkte Extraktion mit Lösungsmitteln 72

3.5.2.3. Hydrophobe Chromatografie 72

3.5.3. Zusammenfassung 82

3.6. Untaugliche Anreicherungsmethoden und ihre Bedeutung für die Charakterisierung 83

3.6.1. Fällung 83

3.6.2. Extraktion 84

3.6.3. Chromatografie 85

3.6.3.1. Ionenaustausch als Trennprinzip 85

3.6.3.1.1. DEAE-Cellulose 85

3.6.3.1.2. Andere Cellulosen 89

3.6.3.1.3. Andere Ionenaustauscher 93

3.6.3.1.4. Zusammenfassung 93

3.6.3.2. Molekülgröße als Trennprinzip 94
3.6.3.3. Affinität als Trennprinzip 97
3.6.3.4. Adsorption als Trennprinzip 99
3.6.4. Zusammenfassung 101

3.7. Chemische und physikalische Charakterisierung 103
3.7.1. Temperaturstabilität 103
3.7.2. Säurestabilität 105
3.7.3. Adsorption an Aktivkohle 105
3.7.4. Dialyse 109
3.7.5. Veresterung 111
3.7.6. Dansylierung 113
3.7.7. Sonstiges 114
3.7.8. Zusammenfassung 114

3.8. Biochemische Charakterisierung 117
3.8.1. Enzymbehandlung 117
3.8.1.1. Proteasen 117
3.8.1.2. Andere Enzyme 120
3.8.1.2.1. Phosphatasen 120
3.8.1.2.2. Phospholipase C 122
3.8.1.2.3. Neuraminidase 124
3.8.2. Denaturierung 126
3.8.3. Spezifische Spaltungen 128
3.8.4. Zusammenfassung 129

3.9. Hinweise auf den Wirkmechanismus 131

3.9.1. Hemmeffekt auf die Neusynthese von cyclo AMP 132

3.9.2. Hemmeffekt auf die Basisaktivität 134

3.9.3. Hemmeffekt bei Choleratoxin-Stimulation 136

3.9.4. Reversibilität des Hemmeffektes 141

3.9.5. Zeitverlauf des Hemmeffektes 147

3.9.6. Hemmeffekt auf Homogenate und Membranen 150

3.9.7. Zusammenfassung 153

3.10. Hypothetische Kandidaten 155

3.10.1. Phosphatidsäure 155

3.10.2. Bilirubin 159

3.10.3. Thrombocyten-aktivierender Faktor 160

3.10.3.1. Diskussion 162

3.10.4. Sonstige 163

3.10.5. Zusammenfassung 165

4. Zusammenfassung 167

5. Diskussion 171

6. Ausblick 175

7. Experimentelle Einzelheiten 177

7.1. Materialien 177

7.1.1. Geräte 177

7.1.1.1. Klammerfreies Membranfiltrationsgerät mit automatischer Filterbelüftung 177

7.1.1.2. Sonstige Geräte 180

7.1.2. Sonstige Hilfsmittel 183

7.1.3. Reagentien und Enzyme 184

7.2. Zellkultur 186

7.2.1. Methode 186

7.2.2. Anzucht in serumfreiem Medium 186

7.2.3. Gliomazellinie C6-BU-1 187

7.2.4. Leberzellinie BRL-3C4 188

7.3. Routinemethoden 188

7.3.1. Serumgewinnung 188

7.3.2. Herstellung des Acetonpulvers 189

7.3.3. Probenvorbereitung und Reaktivierung 190

7.3.4. Inkubation der Testzellen 190

7.3.5. Bestimmung des gebildeten cyclo AMP 191

7.3.6. Bestimmung der Ausbeute 191

7.3.7. Proteinbestimmung 192

7.3.8. Datenaufbereitung 193

7.3.9. Vorbehandlung der Dialyseschläuche 193

7.4. Versuchsbeschreibungen 195

7.4.1. Versuche zur Isolierung 195

7.4.1.1. Adsorption von proteingebundenem Diabolin an DEAE-Cellulose 195

7.4.1.2. Adsorption von proteinfreiem Diabolin an Säulenmaterial 196

7.4.1.3. Säulenchromatografie an DEAE--Cellulose 196

7.4.1.4. Chromatografie an einer Kieselgelsäule 197

7.4.1.5. Chromatografie an Kieselgelplatten (analytisch) 198

7.4.1.6. Chromatografie an Kieselgelplatten (präparativ) 199

7.4.1.7. Molekularsiebchromatografie 200

7.4.1.8. Chromatografie an Concanavalin A--Sepharose 201

7.4.1.9. Chromatografie an Hydroxylapatit 201

7.4.1.10. Affinitätschromatografie an Cibacron Blue F-3-GA 202

7.4.1.11. Adsorption an Aktivkohle 203

7.4.1.12. Chromatografie in organischem Lösungsmittel 204

7.4.1.13. Lösungsmittelextraktion von Acetonpulver im "batch"-Verfahren 204

7.4.1.14. Lösungsmittelextraktion von Acetonpulver im Säulenverfahren 205

7.4.2. Versuche zur Charakterisierung 205

7.4.2.1. Behandlung mit Proteinase K 205

7.4.2.2. Behandlung mit Trypsin 206

7.4.2.3. Behandlung mit Pepsin 206

7.4.2.4. Behandlung mit Alkalischer Phosphatase 207

7.4.2.5. Behandlung mit Neuraminidase 208

7.4.2.6. Behandlung mit Phospholipase C 208

7.4.3. Versuche zur Strukturaufklärung 209

7.4.3.1. Veresterung unter milden Bedingungen 209

7.4.3.2. Dansylierung 210

7.4.3.3. Behandlung mit Bromcyan 211

7.4.3.4. Behandlung mit Periodat 212

7.4.3.5. Bestimmung von organischem Phosphat 212

7.4.3.6. Bestimmung von oxidierbarem Zucker 213

7.4.4. Versuche zum Wirkmechanismus 213

7.4.4.1. Kinetik der Hemmwirkung 213

7.4.4.2. Inkubation mit Choleratoxin 214

7.4.4.3. Versuche mit Zellmembranen und -homogenaten 214

7.4.4.4. Komplexierung von Calciumionen 215

7.4.5. Sonstiges 216

7.4.5.1. Vorinkubation des Serums mit Zellkontakt und Konditionierung 216

7.4.5.2. Herstellung der Zellextrakte von Leber- und Gliomazellen 216

7.4.5.3. SDS-Gelchromatografie 217

8. Literaturhinweise 221

Lebenslauf

Liste der im Text verwandten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACD	Ascorbinsäure-Citronensäure-Dextrose
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
bu	biologische Einheit (biological unit), Dimension der Diabolinmenge
BUdR	5-Bromo-2'-desoxyuridin
cyclo AMP	3':5'-cyclisches Adenosinmonophosphat
DMEM	von Dulbecco modifiziertes Eagles Medium (Dulbecco's modified Eagle's medium)
DTT	Dithiothreitol
fap-	an Fettsäuren verarmt (fatty acid poor)
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hrsg.	Herausgeber
HSA	Humanserumalbumin
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IgG	Immunglobulin G
IVC_{50}	inhibitorische Volumenkonzentration : Volumenkonzentration [%(v/v)] an Serum, die eine 50 %ige Hemmung der Grundstimulation bewirkt
Kap.	Kapitel
Mm	Molmasse
n.b.	nicht bestimmt
OAc	Acetat

PAF	Thrombocyten-aktivierender Faktor (platelet activating factor)
PBS	mit Phosphat gepufferte, isotonische Salzlösung (phosphate buffered saline)
PBS/Azid	PBS mit 0.02 %(w/v) NaN_3
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
Seq	Serumäquivalenz, serumäquivalent (serum equivalent)
SF	serumfrei(es)
Tab.	Tabelle
TCE	Trichloressigsäure
TLC	Dünnschichtchromatografie (thin layer chromatography)
VT	Volumenteil(e)
%(v/v)	Volumenprozent (volume/volume)
%(w/v)	Gewichtsprozent (weight/volume)

Liste der im Text verwandten halbsystematischen, Trivial- und Handelsnamen

ACTH	Corticotropin (adrenocorticotropes Hormon)
Adenylatcyclase	ATP-pyrophosphate-lyase (cyclisierend) [EC 4.6.1.1.]
Catecholamin	2-(3',4' -Dihydroxyphenyl)-2-hydroxy-ethylamin
Cholin-	N,N,N-trimethyl-2-hydroxyethylammonium-
Coomassie Blue	4-Hydroxy-5-[[4-(phenylamino)-5-sulfo--1-naphtalenyl]azo] -2,7-naphthalin-disulfonsäure Trinatriumsalz
Creatinkinase	ATP: creatine-N-phosphohydrolase [EC 2.7.3.2.]
Dansylchlorid	6-(N,N-dimethylamine)-naphthyl-1-sulfon-säurechlorid
Diabolin	Trivialname des im Serum enthaltenen Hemmfaktors der intrazellulären cyclo AMP-Synthese
Diisobutylketon	2,6-Dimethyl-4-ketoheptan
Ethylenglykol	Ethan-1,2-diol
G/F-Protein	Guanylnucleotid-bindendes Protein
GTPase	GTP phosphohydrolase [EC 3.6.1.]
Histamin	4-(2'-Aminoethyl)-1,3-diazol
Isoproterenol	2-(3',4'-Dihydroxyphenyl)-2-hydroxy--N-(2'-propyl)-ethylamin
Leu-Enkephalin	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH
Mercaptoethanol	2-Thioethanol
Met-Enkephalin	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH

Neuraminidase	Acylneuraminyl hydrolase [EC 3.2.1.18]
Noradrenalin	2-(3',4'-Dihydroxyphenyl)-2-hydroxy-ethylamin
Phosphodiesterase	3':5'-cyclic-AMP-5'-nucleotidohydrolase [EC 3.1.4.17]
Phospholipase C	Phosphatidylcholine cholinephospho-hydrolase [EC 3.1.4.3]
Piperazin	Perhydro-1,4-diazin
Ribonuclease	[EC 3.1.27]
Sulfosalicylsäure	3-Carboxy-4-hydroxybenzolsulfonsäure
ZK 62 711	4-(3-Cyclopentyloxy-4-methoxyphenyl)--2-Pyrrolidon; Inhibitor von cyclo AMP-Phosphodiesterasen

Allgemeine Bemerkungen zur grafischen Darstellung von Meßdaten

Sämtliche Diagramme wurden von einem Dreifarben-Benson-Plotter im Rechenzentrum der Universität Würzburg erstellt. Das dazugehörige Plotprogramm entscheidet für jeden Datenpunkt selbständig, ob und gegebenenfalls in welche Richtung der Balken zur Angabe der Standardabweichung (Grundgesamtheit) gezeichnet werden soll. Die Zeichnung der Balken von Meßpunkten mit gleicher Abszissenkoordinate erfolgt aufgrund der Programmlogik mit folgenden Restriktionen:

1. Liegt ein zu zeichnender Balken innerhalb des zugehörigen Symbols, wird er in beiden Richtungen unterdrückt.

2. Liegt das Symbol einer anderen Kurve innerhalb des zu zeichnenden Balkens, so wird der Balken unterdrückt. Dies kann im Extremfall zur Unterdrückung der Fehlerbalken in beiden Richtungen führen. In diesen Fällen liegt nie ein signifikanter Unterschied zwischen zwei Datenpunkten vor.

3. Überschneiden sich zwei Fehlerbalken, so wird immer der kleinere Balken unterdrückt, vorausgesetzt der größere paßt in den Symbolzwischenraum.

4. Haben zwei Symbole die gleichen Koordinaten, so gehört der nach oben gerichtete Balken zur zuerst gezeichneten Kurve, wiederum vorausgesetzt, die alternative Balkenzuordnung ist nicht durch andere Restriktionen vorgegeben.

1. EINFÜHRUNG

Die schnelle und gezielte Übermittlung von Information ist nicht nur in höheren Organismen ein zentrales Problem. Die Natur hat zur Steuerung ihrer komplexen Systeme mehrere Methoden entwickelt. Eine davon, die Verwendung von Signalstoffen (Hormonen) und dafür spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen ist dadurch ausgezeichnet, daß nur ein vergleichsweise geringer Aufwand (an Syntheseenergie) bei der Signalübertragung selbst erforderlich ist.

Mit hoher Intensität untersucht wurden bisher vor allem die Signalübertragungssysteme, die das 3':5'-cyclische Adenosinmonophosphat (cyclo AMP) (Sutherland & Rall, 1958) als zweiten freidiffundiblen Informationsträger ("Botenstoff" oder "second messenger") benützen.

Von verschiedenen hormonellen Effekten wurde gezeigt, daß sie über eine erhöhte Bildung von intrazellulärem cyclo AMP aufgrund einer Stimulation der membrangebundenen Adenylatcyclase vermittelt werden (Robison et al., 1968 und 1971). Zu den hormonellen Signalen, die über diesen Mechanismus verstärkt werden, gehören u.a. die adrenergen Effekte der Catecholamine am ß-Rezeptor (Rall & Sutherland, 1958), die Effekte verschiedener Polypeptide wie Glucagon (Posternak, 1971; Bataille et al., 1974), Secretin (Case et al., 1969; Propst et al., 1979) oder ACTH (Haynes, 1958), die Wirkungen einiger Prostaglandine in speziellen Zielgeweben (Hamprecht & Schultz, 1973; van Calker et al., 1979), sowie Effekte hormonaler Faktoren wie Adenosin (Sattin & Rall, 1970; Clark et al., 1974) oder Histamin (Clark & Perkins, 1971).

Von all diesen Strukturen kann insbesondere die Kopplung des stimulierten ß-Rezeptors an das Adenylatcyclase--System der Plasmamembran als in seinen Grundzügen verstanden gelten (Levitzki & Helmreich, 1979), wenn auch sowohl die Komponenten selbst als auch ihre Wechselwirkungen untereinander noch ihrer Aufklärung harren. Dieses System besteht aus mindestens drei Komponenten, dem Hormonrezeptor, dem katalytisch aktiven Teil der Adenylatcyclase und einem Guaninnucleotid-bindenden Protein (G/F-Protein) (Pfeuffer, 1977).
Die Wechselwirkung zwischen Hormon und Rezeptor führt zu einer Bindung des Rezeptors an das G/F-Protein (Limbird et al., 1980) und dort zu einem Austausch zwischen GDP und GTP (Cassel & Selinger, 1978). Infolge dieser Beladung mit GTP bindet das G/F-Protein an die Adenylatcyclase (Tolkowsky & Levitzki, 1978) und aktiviert dadurch das cyclisierende Enzym (Pfeuffer, 1979). Diese Aktivierung wird durch eine dem G/F-Protein inhärente GTPase-Aktivität beendet (Cassel & Selinger, 1977).

Das weitere Schicksal des cyclischen AMP, des ersten Gliedes in dieser Signalübertragungskette, das intrazellulär nachgewiesen werden kann, ist weitgehend geklärt. Von den im Cytosol enthaltenen Proteinen können lediglich zwei durch radioaktives cyclo AMP markiert werden, je eine regulatorische Untereinheit des Typs I und II der cyclo AMP-abhängigen Proteinkinase (Walter et al., 1977 und 1978). Mindestens eine cyclo AMP-spaltende Phosphodiesterase (Butcher & Sutherland, 1962) löscht den Informationsgehalt dieses Botenstoffes.

Die Analyse solcher Signalübertragungsketten und ihre Regulation ist besonders interessant in Nervenzellen, die, was ihre Fähigkeiten zur Informationsverarbeitung angeht, besonderen Ansprüchen genügen müssen, sowohl hinsichtlich der Datenmenge, als auch der Spezifität und Geschwindigkeit ihrer Verarbeitung.

Die Signalübertragung durch eine biologische Membran kann durch die Wirkung der entsprechenden Agonisten und Antagonisten am Rezeptor beeinflußt werden. Darüberhinaus sind eine Reihe physiologischer wie unphysiologischer (natürlich vorkommender wie künstlicher) Modulatoren bekannt, die zwischen Rezeptor und Enzym in den Signalfluß eingreifen können. Dazu zählen z.B. Lipide (Leon et al., 1978), Choleratoxin (Field, 1971; Cassel & Pfeuffer, 1978), Fluoridionen (Perkins, 1973) und GTP-Analoga (Londos et al., 1974).

Einer der physiologischen Faktoren, der sich hemmend auf die Informationsübertragung in solchen Systemen auswirkt, verdankt seine Entdeckung einem Zufall und ist Gegenstand dieser Untersuchungen.

Bei dem Versuch der Erzeugung von Antikörpern gegen adrenerge ß-Rezeptoren stieß D. van Calker in unserem Laboratorium auf das Phänomen, daß bereits das Serum immunologisch naiver Kontrolltiere die intrazelluläre Anhäufung von cyclo AMP in ß-adrenerg stimulierten C6-BU-1 Gliomazellen hemmt (van Calker, 1977). Diese Hemmaktivität des Serums ist das bisher einzige bekannte Agens, das die hormonell stimulierte cyclo AMP-Bildung in Gliomazellen hemmend zu beeinflußen vermag.

Hier knüpft die vorliegende Arbeit an.

2. LITERATURSTAND UND PROBLEMSTELLUNG

Drei andere Arbeitskreise haben bisher Daten über die Aktivität im Serum veröffentlicht, die die hormonell stimulierte Anhäufung von intrazellulärem cyclo AMP hemmt (Bashor & Saier, 1976; Hsu & Brooker, 1977; Koschel, 1977). Eine Gegenüberstellung der widersprüchlichen Ergebnisse ist in Tab. 1 gezeigt.

Dabei überrascht, daß sich sogar die Angaben über Hitze- und Säurestabilität des Serumfaktors, zwei vergleichsweise einfach durchzuführende Experimente, gegenseitig ausschließen (Tab. 1). Nur eine einzige Arbeit (Koschel, 1977) legt sich ausdrücklich auf die Proteinnatur des gesuchten Faktors fest, während sich die anderen beiden mit Grenzangaben zur Molekularmasse der Aktivität behelfen.
Hsu und Brooker berichten außerdem, daß die Serumaktivität durch Inkubation mit Zellen vollständig verloren geht (Hsu & Brooker, 1977).
Alle anderen bekannten Daten zur Charakterisierung wurden in der bis heute ausführlichsten Arbeit über diesen Serumfaktor von D. van Calker (1977) erhoben:

1. Die Hemmwirkung ist unabhängig vom Lipidgehalt des Serums.
2. Die Hemmwirkung ist unabhängig vom Lipoproteingehalt des Serums.
3. Das hemmende Material ist nicht dialysierbar [3 d, 4 ^{o}C].
4. Die Hemmsubstanz ist resistent gegen Säure [pH 1.0, 1 h, 25 ^{o}C] und Alkali [pH 12.0, 1 h, 25 ^{o}C].
5. Die Hemmsubstanz ist mit Na_2SO_4 fällbar [Endkonzentration 18 %(w/v)].

6. Die Hemmwirkung geht bei Behandlung mit TCE [Endkonzentration 5 %(w/v)] irreversibel verloren.
7. Die Hemmwirkung wird durch Behandlung mit Ribonuclease [1 mg/ml, 30 min, 37 °C] nicht beeinträchtigt.
8. Die Hemmwirkung geht durch Einwirkung von Phosphodiesterase [0.1 mg/ml, 30 min, 37 °C] teilweise verloren.
9. Die Hemmwirkung wird durch Alkalische Phosphatase [10 µg/ml, 30 min, 37 °C] weitgehend zerstört.

Für diesen Faktor wurde in vorliegender Dissertation die Bezeichnung "Diabolin" gewählt, aufgrund der unerwarteten Hartnäckigkeit, mit der sich dieser Serumfaktor bisher seiner Isolierung und Identifizierung entzog.

In der Literatur findet sich auch ein Hinweis, daß Serum den genau gegenteiligen Effekt als den in dieser Arbeit untersuchten haben soll, nämlich eine Steigerung der durch Prostaglandin E_1 hervorgerufenen Anhäufung von intrazellulärem cyclo AMP (Anderson, 1979).

Ziele der vorliegenden Arbeit waren

1. die offensichtlichen Widersprüche der Literaturangaben sowohl untereinander als auch zu früheren Befunden des eigenen Arbeitskreises (van Calker, 1977) über diese Hemmaktivität im Serum zu überprüfen bzw. zu erklären;

2. durch weitgehende Isolierung und Charakterisierung dieses Faktors die Voraussetzungen für seine Identifizierung und die Untersuchung seines Wirkungsmechanismus zu schaffen, und

3. schließlich den gesuchten Faktor zu identifizieren.

Tab. 1: Gegenüberstellung bisher publizierter Daten über Aktivitäten im Serum, die die cyclo AMP-Bildung hemmen.

(Hsu & Brooker, 1977)	(Koschel, 1977)	(Bashor & Saier, 1976)
Hemmeffekt auf Ratten--Gliomazellen C6-2B	Ratten-Gliomazellen C6	Ratten-Gliomazellen C6, menschliche Fibroblasten WI38
Aktivität ist		
- hitzestabil (20 min, 94 °C)	- hitzelabil	- hitzelabil
- fällbar durch $(NH_4)_2SO_4$	- fällbar durch $(NH_4)_2SO_4$	- fällbar durch $(NH_4)_2SO_4$
- nicht dialysierbar	- Protein (Mm > 75 kg/mol)	- Mm > 50 kg/mol
- Aktivitätsverlust (50 %) durch Trypsinbehandlung	- sensitiv gegen Trypsin	
- fällbar mit organischen Lösungsmitteln	- stabil gegen organische Lösungsmittel	
- säurestabil (pH 2.5) - alkalistabil (pH 10.0)	- säurelabil	
- verschieden von Albumin Globulin Insulin freien Fettsäuren	- Albumin Globulin	- Albumin Insulin Somatomedin A, B und C fibroblast growth factor (FGF) nerve growth factor (NGF) Concanavalin A

3. E R G E B N I S S E

3.1. Optimierung des biologischen Testsystems

3.1.1. Prinzip des biologischen Tests

Zwischen 50000 und 300000 Gliomazellen C6-BU-1 (sofern nichts anderes angegeben) werden routinemäßig in den 24 Kleinkulturschalen (Durchmesser 15 mm) einer Mehrfach--Gewebekulturplatte 48 h lang in je 1 ml serumfreiem DMEM-Medium gezüchtet. Die Passagenummer gibt die Anzahl der Subkultivierungen an, denen die Zellen unter Verwendung einer 0.05 %igen (w/v) Trypsinlösung unterworfen wurden. Die Passagenummer der im Test verwandten Gliomazellen liegt ausnahmslos zwischen Passage 22 und 39. Sie hat keinen erkennbaren Einfluß auf das hier angewandte Testsystem.

Unmittelbar vor Versuchsbeginn wird das Anzuchtmedium abgesaugt. Der am Plastikboden haftende Zellrasen wird einmal mit 0.5 ml eiskaltem Hepes-gepuffertem DMEM-Medium gewaschen und - im Eisbad stehend - mit 0.25 ml kaltem Hepes-gepuffertem Inkubationsmedium überschichtet, in dem das stimulierende Hormon bereits gelöst vorliegt. Wenn nichts anderes vermerkt, wird L-Noradrenalin in einer Endkonzentration von 0.2 mmol/l als Agonist eingesetzt. Noch im Eisbad stehend, werden in jede Kleinkulturschale je 10 µl PBS/Azid (Grundstimulation) oder des entsprechend mit PBS/Azid verdünnten Serums (bzw. Serumäquivalents) zupipettiert.

Die Hauptinkubation (10 min) erfolgt in einem 39 °C (die Temperatur des Inkubationsansatzes beträgt 37 °C) warmem

Wasserbad und wird durch Zusatz von Ethanol gestoppt. Anschließend wird das intrazellulär gebildete cyclo AMP mit Hilfe eines Isotopenverdünnungstests bestimmt. Der Proteingehalt in Parallelinkubationen schwankt in Abhängigkeit von der angesäten Zelldichte zwischen 8 und 50 µg je Kleinkulturschale.

Jeweils zu Beginn und am Ende des Pipettiervorgangs werden die Zellen in je drei Kleinkulturschalen zur Bestimmung der Grundstimulation herangezogen. Diese Zellen werden neben dem Agonisten lediglich mit PBS/Azid konfrontiert. Ihr Adenylatcyclase-System ist deshalb unter den Versuchsbedingungen maximal stimuliert (Grundstimulation). Die maximal erzielbaren cyclo AMP-Bildungsraten schwanken von Versuch zu Versuch zwischen 850 und 1330 pmol/mg Protein.
Bei allen Versuchen wird als positive Kontrolle der Diabolinaktivität die Hemmwirkung einer über mindestens drei Größenordnungen verdünnten Lösung von Acetonpulver in PBS/Azid gemessen.

3.1.2. Definition einer Einheit

Serum hemmt die hormonell stimulierte intrazelluläre Anhäufung von cyclo AMP (Bashor & Saier, 1976; Koschel, 1977; Hsu & Brooker, 1977; van Calker, 1977). Diese Hemmung ist abhängig von der Konzentration des Serums im Inkubationsmedium (Abb.1). Die prozentuale Erniedrigung der ungehemmten, maximalen Grundstimulation (= 0 % Hemmung), aufgetragen gegen die Serumkonzentration im Inkubationsansatz (gemessen gegebenenfalls in Volumenäquivalenten des

ursprünglichen Serums) ergibt eine sigmoidale Dosis--Wirkungs-Kurve. Einzig reproduzierbare Größe ist die prozentuale Hemmung. Formal negative prozentuale Hemmungen sind als (meist nichtsignifikante) Stimullation zu interpretieren.

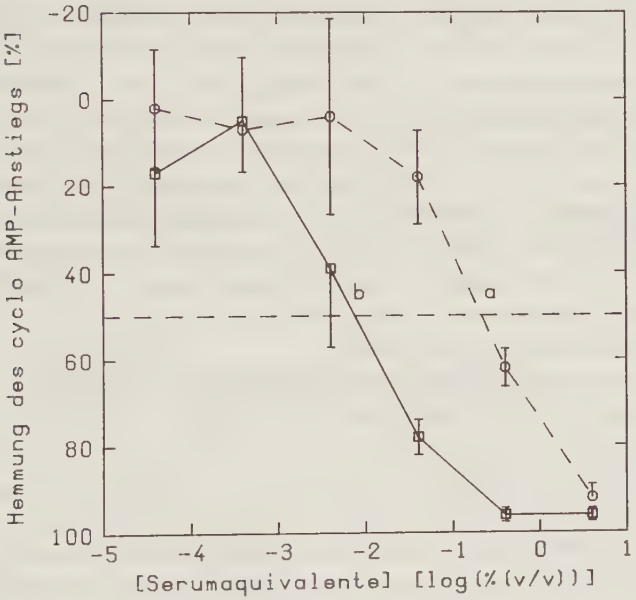


Abb. 1: Hemmaktivität von Humanserum und einer Albuminlösung auf den durch L-Noradrenalin hervorgerufenen Anstieg des cyclo AMP-Spiegels in Gliomazellen C6-BU-1.

Kurve a: Albuminlösung* [6 %(w/v)] in PBS [1570 bu/ml]

Kurve b: Humanserum [43000 bu/ml]

* BEHRING-Werke AG, Marburg, Lotnr.: 225055 A, siehe auch Kap. 3.2.1.1.

Die Menge an Diabolin wird in biologischen Einheiten [bu] ausgedrückt, die Diabolinkonzentration c_{Diab} (z.B. des Serums) in [bu/ml].
Die im Testsystem erzielte Hemmung ist der eingesetzten Diabolinkonzentration nicht direkt proportional. Dagegen steht die Lage des Wendepunktes einer Dosis-Wirkungs-Kurve für Diabolin (Abb.1) in einer einfachen Beziehung zur Konzentration der getesteten Diabolinlösung c_{Diab}.

Der Abszissenabschnitt des Wendepunktes gibt diejenige Diabolinkonzentration im Testansatz an, bei der die Grundstimulation zu 50 % gehemmt wird. Die Konzentration von Diabolin (z.B. von Serum) im Testansatz wird sinnvollerweise in Volumenprozent angegeben. Entsprechend wird auch die Diabolinkonzentration im Inkubationsansatz, die eine - gegebenenfalls linear interpolierte - 50 %ige Hemmung hervorruft (IVC_{50}) grafisch oder rechnerisch in Volumenprozent ermittelt.
Die Konzentration der zu testenden Diabolinlösung (c_{Diab}) und IVC_{50} sind einander umgekehrt proportional:

$$c_{Diab} = k \cdot (IVC_{50})^{-1} \qquad (1)$$

IVC_{50} wird 1, wenn die zu testende Diabolinlösung (c_{Diab}) bei 1 %(v/v) Zusatz zum Inkubationsansatz 50 % Hemmung hervorruft. In diesem Fall wird

$$c_{Diab} = k \qquad (2)$$

Der Proportionalitätsfaktor k ist unbekannt. Er wird willkürlich gleich 1 gesetzt

$$k = 1 \ [bu/ml] \qquad (3)$$

und als Einheitskonzentration, mit der Dimension [bu/ml], festgelegt.
Im Koordinatensystem für die Dosis-Wirkungs-Beziehung (Abb. 1) wird damit willkürlich ein Norm-Wendepunkt ausgezeichnet, auf den die Wendepunkte aller Dosis-Wirkungs--Kurven (IVC_{50}-Werte) bezogen werden. Die Konzentrationen beliebiger Diabolinlösungen ergeben sich somit als Vielfache der Einheitskonzentration mit der Dimension [bu/ml]. Aus Gleichung (1) und (3) ergibt sich die vereinfachte Beziehung

$$c_{Diab} = (IVC_{50})^{-1} \text{ [bu/ml]} \quad . \qquad (4)$$

Mit ihrer Hilfe läßt sich die Konzentration einer Diabolinlösung aus dem experimentell ermittelten IVC_{50}-Wert errechnen.

3.1.3. Variation der Anzuchtbedingungen

Unabdingbare Voraussetzung für die Anreicherung eines jeden Faktors ist - neben einer ausreichenden Quelle - ein einfaches und möglichst empfindliches Testsystem.

3.1.3.1. Anzucht in serumfreiem Medium

Die Anzucht der Testzellen in serumfreiem Medium steigert ihre Sensitivität gegenüber Diabolin um ein bis zwei Größenordnungen. Außerdem erhöhen diese Kulturbedingungen das Ausmaß der maximal erzielbaren Hemmung (Wagner, 1978).

Die Grundstimulation, also der durch die ungehemmte hormonelle Stimulation maximal erreichbare intrazelluläre Spiegel an cyclo AMP, ist abhängig vom Serumgehalt des Anzuchtmediums. Die ungebremste Stimulierbarkeit der Zellen ist nach Kultivierung (48 h) in serumfreiem Medium (experimentelle Einzelheiten unter 7.2.2.) deutlich erniedrigt (Abb.2).
Dieser Verlust an Agonisteneffekt ist nicht auf das Auftreten hemmender adrenerger α_2-Rezeptoren zurückzuführen (Wagner, 1978).

Es wäre denkbar, daß sich nach Anzucht der Zellen in serumfreiem Medium die Potenz des Agonisten an diesen Zellen verändert (Darfler et al., 1981), in diesem Fall verringert. Das Experiment zeigt jedoch keinen Unterschied im qualitativen Verlauf der Dosis-Wirkungskurven für L-Noradrenalin in An- und Abwesenheit von Serum während der Anzucht (Abb.2). Eine Änderung der Potenz des Agonisten am Rezeptor der Zelloberfläche scheidet daher als mögliche Erklärung für die verminderte Grundstimulation der Zellen nach Serumentzug aus.
Ein größeres Verständnis für dieses Phänomen könnte die Bestimmung der Rezeptorendichte auf der Zelloberfläche in Abhängigkeit von den Anzuchtbedingungen erbringen. Es ist nämlich bekannt, daß die Rezeptorendichte für Isoproterenol auf den Gliomazellen C6-BU-1 vom Serumgehalt des Anzuchtmediums abhängt (Dibner & Insel, 1981). In den zitierten Versuchen nimmt die Zahl der ß-Rezeptoren auf den Zellen bei Anzucht in Abwesenheit von fötalem Kälberserum deutlich zu. Dabei wird allerdings, im Gegensatz zu den oben beschriebenen Versuchsbedingungen (Abb.2), eine Faktormischung als Serumersatz zugesetzt, die die Zellproliferation voll aufrecht erhält (Dibner et al., 1981).

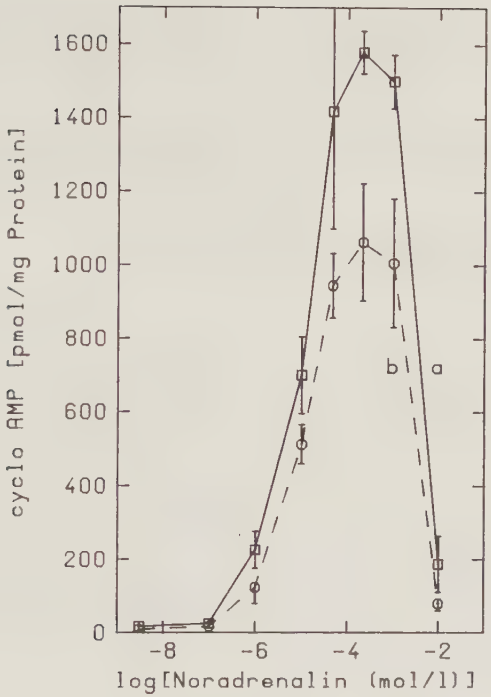


Abb. 2: Einfluß des Serumgehaltes im Anzuchtmedium von Gliomazellen C6-BU-1 auf Potenz und Maximaleffekt von L-Noradrenalin.
Zellprotein/Schale: 82 µg (mit Serum)
13 µg (ohne Serum)

Kurve a: Anzucht in 90 %(v/v)DMEM/10 %(v/v) FCS-Medium

Kurve b: Anzucht in serumfreiem Medium (48 h).

Extensives Waschen der Zellen vor ihrer Anzucht unter serumfreien Bedingungen (experimentelle Einzelheiten unter 7.2.2.) führt weder zu einer weiteren Sensitivitätserhöhung gegenüber der Wirkung von Diabolin, noch zu einer Änderung quantitativer Relationen von verschieden aktiven Fraktionen zueinander (Daten nicht gezeigt).

3.1.3.2. Mediumzusätze als Serumersatz

Bottenstein und Sato erkannten als erste (Bottenstein & Sato, 1979), daß Zusatz eines Gemisches aus fünf Ingredientien zum Kulturmedium anstelle des Serums, nämlich Insulin (Endkonzentration: 5 µg/ml), Putrescin (100 µmol/l), Transferrin (100 µg/ml), Progesteron (20 nmol/l) und Na_2SeO_3 (30 nmol/l) auf Ratten-Neuroblastoma-Zellen (Clon B104) einen Proliferationsstimulus auslöst, der von dem durch Serum hervorgerufenen nicht zu unterscheiden ist. Jede Komponente dieser als "N2-Medium" bekannt gewordenen Mischung ist essentiell. Um den eutrophen Effekt für verschiedene Zelltypen zu optimieren, wurde inzwischen eine Reihe von Mediumzusätzen entwickelt, die qualitativ von der oben zitierten Zusammensetzung abweichen (Brunner et al., 1982).

Der Sensitivitätsverlust der Testzellen gegenüber Diabolin als Folge ihrer Anzucht in Gegenwart von Serum kann entweder eine spezifische Antwort der Zellen auf die Anwesenheit von Diabolin selbst, oder aber eine Folge anderer Effekte des Serums sein wie die Stimulation von Zellgrößenwachstum und Proliferation. Um das zu entscheiden, werden Gliomazellen C6-BU-1 in N2-Medium 48 h lang kultiviert. Die Zellen erreichen in serumhaltigem Medium eine

wesentlich höhere Zelldichte (Abb.3) und zeigen eine geringere morphologische Differenzierung (Fan & Uzman, 1977) als in N2-Medium.

Die Gretchenfrage aber ist nun, wie halten es die unter diesen Bedingungen gezüchteten Zellen mit der Sensitivität gegenüber Diabolin (bzw. Serum)?
Die speziellen Ingredientien des N2-Mediums selbst üben keinerlei Hemmeffekt aus auf die hormonell stimulierte cyclo AMP-Anhäufung in Gliomazellen (Daten nicht gezeigt).

Die Dosis-Wirkungs-Kurve für Serum, gemessen an Zellen, die in N2-Medium gezüchtet wurden, liegt zwischen den beiden Kontrollkurven, die erhalten werden, wenn Serum im Anzuchtmedium vorhanden war oder fehlte (Abb.4). Die Sensitivität dieser Zellen unterscheidet sich demnach von derjenigen der Kontrollzellen um jeweils denselben Faktor. Der bei Anwesenheit von Serum im Anzuchtmedium hervorgerufene gewaltige Sensitivitätsverlust der Zellen gegenüber Diabolin kann also mit der Teilungsrate nicht direkt korreliert sein, sondern wird möglicherweise durch (einen) spezifische(n) Faktor(en) hervorgerufen. Der Mangel an diesem Faktor(en) wird durch die Zusätze im N2-Medium nur unvollkommen kompensiert.
Unterwirft man Serum einer Acetonfällung (experimentelle Einzelheiten unter 7.3.2.), so fällt Diabolin quantitativ in den Niederschlag (fortan "Acetonpulver" genannt) (Wagner, 1978). Setzt man anschließend entweder das Acetonpulver oder aber das im Überstand der Acetonfällung enthaltene, aus dem Serum stammende Material dem Anzuchtmedium als Serumersatz zu, kann im günstigsten Fall entschieden werden, ob der Sensitivitätsverlust der Zellen

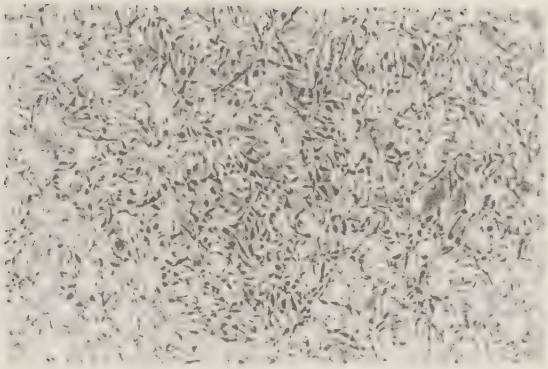
Abb. 3: Einfluß von Serum bzw. den speziellen Zusätzen des N2-Mediums auf Morphologie und Proliferationsverhalten von Gliomazellen C6-BU-1.

a) Anzucht in FCS-Medium
b) Anzucht in N2-Medium
c) Anzucht in SF-Medium.

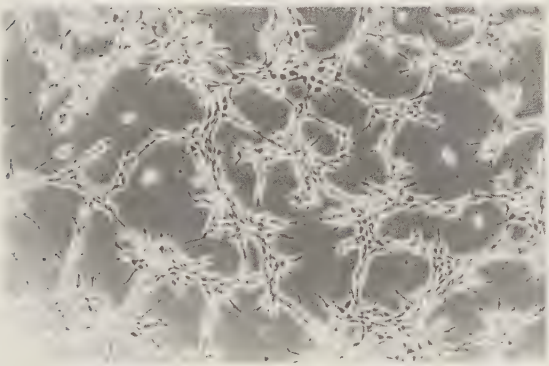
Zellprotein: FCS: 160 µg $\pm$ 10 / Schale
N2 : 74 µg $\pm$ 8 / Schale
SF : 66 µg $\pm$ 12 / Schale

fotografiert mit einem umgekehrten Fotomikroskop: LEITZ-DIAVERT

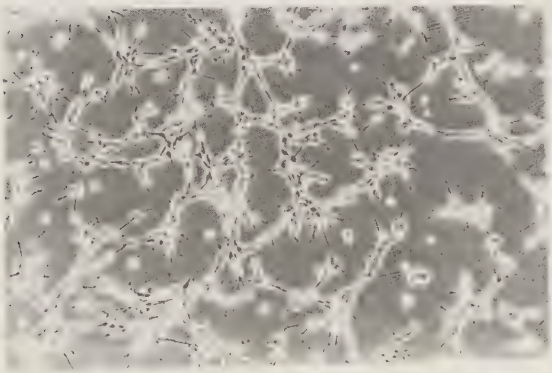
a



b



c



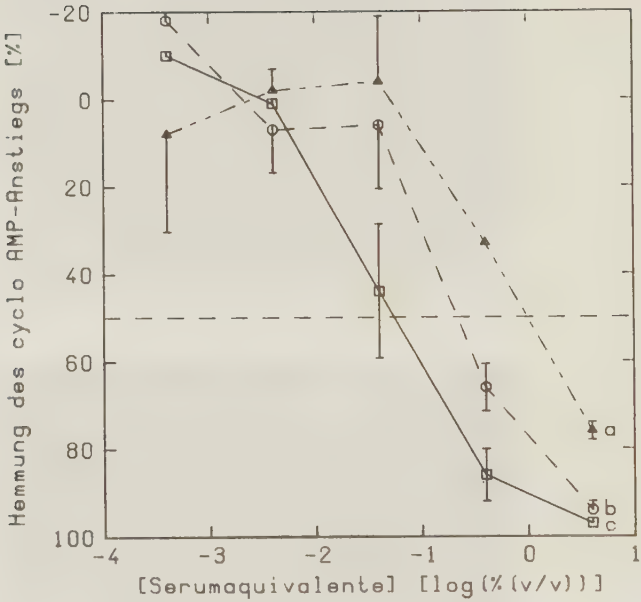


Abb. 4: Einfluß der Zusammensetzung des Anzuchtmediums auf die Sensitivität der Testzellen gegenüber Diabolin.

Diabolinpräparat: Acetonpulver in PBS (Seq)

Kurve a: Anzucht in FCS-Medium

Kurve b: Anzucht in N2-Medium

Kurve c: Anzucht in SF-Medium

gegenüber Diabolin an die Gegenwart dieses Faktors während der Anzucht gebunden ist. Unter dem Mikroskop ist kein Unterschied zwischen Zellen zu erkennen, die in Gegenwart von Acetonpulver oder FCS wuchsen. In beiden Fällen übt der Überstand der Acetonfällung im Anzuchtmedium keinerlei erkennbaren Wachstumsimpuls aus. Andererseits erfolgt aber auch keine morphologische Differenzierung.
Untersuchungen des Einflusses dieser verschiedenen Anzuchtbedingungen auf die Hemmbarkeit der hormonell stimulierten cyclo AMP-Anhäufung könnten zu Einblicken in den Mechanismus des Verlustes an Diablinsensitivität verhelfen.

Zusatz beider "Aceton-Fraktionen" zum Anzuchtmedium führt zu einem teilweisen Sensitivitätsverlust der Testzellen gegenüber Diabolin (Abb. 5). Obwohl der aus Serum gewonnene Acetonüberstand selbst keine Hemmaktivität besitzt (Wagner, 1978), bewirkt seine Gegenwart während der Anzuchtphase der Testzellen einen Verlust an Sensitivität. Dieser Befund führt zu der Schlußfolgerung, daß Diabolin nicht, oder zumindest nicht allein, für diesen Sensitivitätsverlust verantwortlich sein kann. Die Tatsache, daß sowohl im Niederschlag als auch im Acetonüberstand (zehnfacher Acetonüberschuß) trotz unterschiedlicher Hemmwirkung eine Aktivität gefunden wird, die Sensitivitätsverlust erzeugt, läßt mindestens zwei Faktoren erwarten.

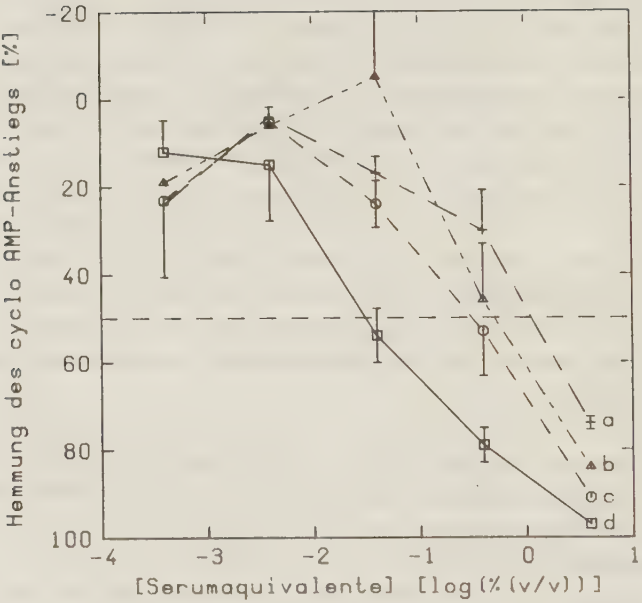


Abb. 5: Einfluß der Zusammensetzung des Anzuchtmediums auf die Sensitivität der Testzellen gegenüber Diabolin.

Diabolinpräparat: Acetonpulver in PBS (Seq)

Kurve a: Anzucht mit Serum [10 %(v/v) FCS].

Kurve b: Anzucht mit Material als Serumersatz, das bei Herstellung des Acetonpulvers im Überstand verbleibt.

Kurve c: Anzucht mit Acetonpulver als Serumersatz.

Kurve d: Anzucht ohne Serumersatz.

3.1.3.3. Variation der Zelldichte

Mehrere Eigenschaften von in Kultur gezüchteten Zellen sind abhängig von der aktuellen Zelldichte (Hamprecht, 1974; Pastan et al., 1975; Liebkalns et al., 1981; Glaser et al., 1982; Heumann et al., 1982). So sinkt z.B. bei Zell-Zell-Kontakt normaler Zellen die Nettoteilungsrate sehr stark ab, während die proteinnormierte Stimulierbarkeit der cyclo AMP-Synthese von Gliomazellen C6 ansteigt (Hamprecht & Schultz, 1973; Morris et al., 1976).
Dramatisch ist der Einfluß der Zelldichte der Testzellen auf die Hemmbarkeit der hormonell stimulierbaren cyclo AMP-Anhäufung durch Diabolin.

Die Sensitivität der Zellen gegenüber Diabolin nimmt nach Anzucht in serumfreiem Medium mit zunehmender Zelldichte ab (Abb.6). Dabei überstreicht der IVC_{50} im Proteinbereich zwischen 2 und 30 µg nicht abwaschbaren Zellproteins je Schale knapp zwei Größenordnungen, erreicht aber bei weitem nicht die Werte, die nach Anzucht der Zellen in Gegenwart von Serum gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Wie weiter unten noch gezeigt werden wird, ist dieser Effekt nicht etwa darauf zurückzuführen, daß das Inkubationsmedium bei Kontakt mit den Zellen an Diabolinaktivität verarmt (Kap. 3.2.1.).
Trägt man die rechnerisch aus Abb. 6 gewonnenen IVC_{50}-Werte gegen das entsprechende Zellprotein auf und berücksichtigt dabei die momentane Nachweisgrenze für cyclo AMP im Isotopenverdünnungstest (0.2 pmol), so ergibt sich als optimaler Kompromiß zwischen Sensitivität der Zellen und Meßgenauigkeit des Nachweises eine Zellproteinmenge von 10 µg je Kleinkulturschale, entsprechend 50000 Gliomazellen C6-BU-1 (Abb.7).

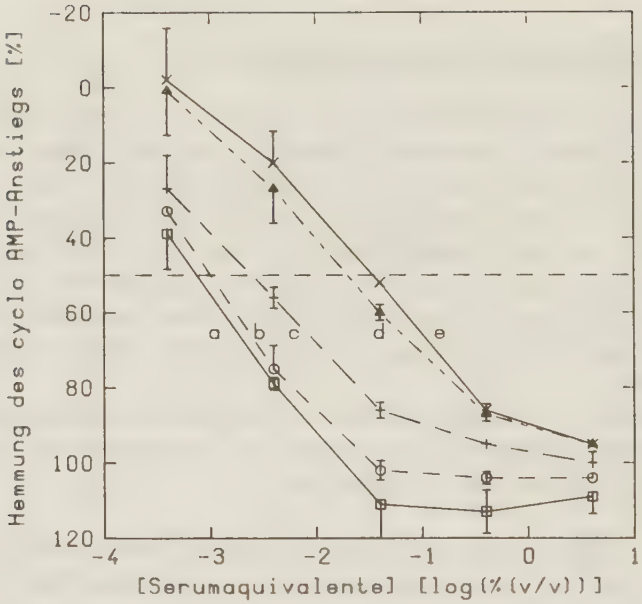


Abb. 6: Einfluß der Zelldichte auf die konzentrationsabhängige Hemmung der Noradrenalin-stimulierten cyclo AMP-Bildung durch Diabolin.

Diabolinpräparat: Acetonpulver in PBS (Seq)

Kurve a: 2 ug Zellprotein/Schale (20000)*

Kurve b: 3,5 ug Zellprotein/Schale (30000)

Kurve c: 10 ug Zellprotein/Schale (50000)

Kurve d: 20 ug Zellprotein/Schale (90000)

Kurve e: 30 ug Zellprotein/Schale (130000)

* Zahl der 48 h vor Versuchsbeginn angesäten Zellen in 1 ml serumfreiem Medium je Kleinkulturschale (Durchmesser 15 mm).

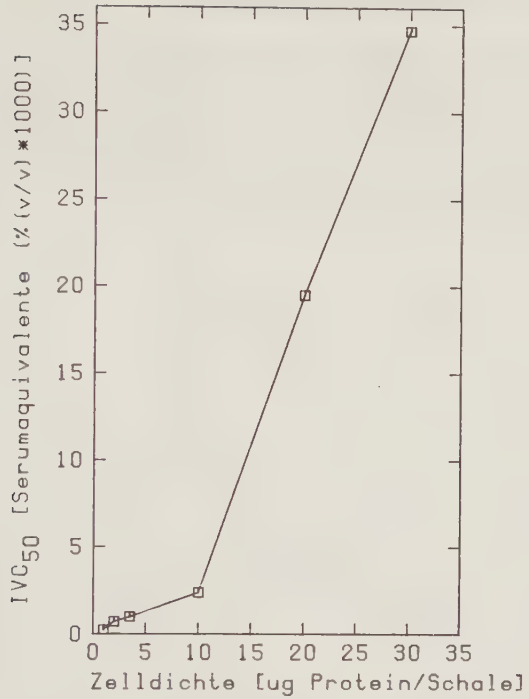


Abb. 7: Zelldichte-Abhängigkeit der zur 50 %igen Hemmung der Grundstimulation notwendigen Diabolinkonzentration im Testansatz (IVC_{50}).

Daten aus Abb.6 entnommen.

3.1.3.4. Änderung der Anzuchtzeit

Frühere Untersuchungen an diesem System ergaben eine optimale Kultivierungsdauer der Zellen in serumfreiem Medium vor Versuchsbeginn von 48 h (Wagner, 1978). Diabolin hemmt aber nach neuntägiger Anzucht der Zellen in serumfreiem Medium den Anstieg des cyclo AMP-Spiegels noch genauso wie nach 2 Tagen (Tab.2).

3.1.4. Variation der Testbedingungen

Es wäre denkbar, daß die beobachtete Hemmung der hormonstimulierten cyclo AMP-Anhäufung in den Zellen durch Serum dadurch zustande kommt, daß Diabolin den Agonisten selbst bindet und sich dadurch die freie Konzentration des Hormons im Inkubationsmedium verringert. Diese Möglichkeit ist jedoch auszuschließen, da sich der Hemmeffekt durch weitere Zugabe von L-Noradrenalin nicht beseitigen läßt (van Calker, 1977; Wagner, 1978). Die Hemmwirkung ist auch unabhängig von der Reihenfolge des Zusatzes von Serum und Hormon zum Inkubationsmedium (Daten nicht gezeigt).

3.1.4.1. Zusätze während der Zellinkubation

Soll mit Hilfe eines biologischen Testsystems eine inhibitorische Aktivität gleich welcher Art isoliert werden, so besteht immer die latente Gefahr, daß störende Agentien aus der Anreicherungsprozedur inhibitorische Aktivität vortäuschen. Diesen Artefakten ist nur mit extensiven

Tab. 2: Einfluß der Kultivierungsdauer der Zellen in serumfreiem Anzuchtmedium auf ihre Sensitivität gegenüber Diabolin.

Zellprotein/Schale: 11 µg (2d)
142 µg (9d)

Diabolinpräparat: Acetonpulver in PBS (Seq)

Anzucht-zeit (h)	Grund-stimulation (pmol cyclo AMP/mg Protein)	Serumäquivalente log (%(v/v)) Hemmung (%)				
		- 3.4	- 2.4	- 1.4	- 0.4	+ 0.6
48	980 ± 41	8 ± 14	n.b.	38 ± 9	70 ± 5	100 ± 2
216	1910 ± 115	17 ± 17	2 ± 14	62 ± 15	96 ± 2	98 ± 2

Kontrollen zu begegnen. Die Kenntnis der das biologische Testsystem störenden Substanzen ist bei einer biochemischen Anreicherung jedenfalls unverzichtbar. In dem hier beschriebenen Testsystem können die Gliomazellen z.B. mit einer wässerigen 2 %igen (w/v) Ampholin-Lösung (pH 3.5--10) oder einer wässerigen 0.03 %igen (w/v) SDS-Lösung anstelle des Serums konfrontiert werden, ohne daß die Grundstimulation beeinflußt wird (Daten nicht gezeigt). In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß Zusätze, die zwar die Stimulierbarkeit der Zellen möglicherweise nicht beeinflussen, trotzdem ein hohes Artefaktpotential aufweisen können, indem sie nämlich die spätere radioimmunologische Bestimmung des gebildeten cyclo AMP stören.

So stellte sich z.B. heraus, daß das Methanoleluat einer Kieselgelsäule, die im Verlauf der Anreicherung von Diabolin zum Einsatz kam (Kap. 3.5.1.2.), eine Substanz enthält, die sich durch Ionenaustauschchromatografie an Polystyrol-Kügelchen nicht von dem in den Zellen gebildeten cyclo AMP abtrennen läßt. Dadurch gelangt sie in den Isotopenverdünnungstest, wo sie konzentrationsabhängig eine erhöhte Bindung des radioaktiven Liganden an das Bindungsprotein bewirkt oder vortäuscht.

3.1.5. Zusammenfassung

1. Die nach Anzucht von Gliomazellen C6-BU-1 in serumfreiem statt serumhaltigem Medium beobachtete erniedrigte hormonelle Grundstimulation ist nicht auf

eine Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve für L-Noradrenalin zurückzuführen.

2. Der nach Anzucht der Zellen in serumhaltigem Medium festgestellte Verlust an Sensitivität gegenüber Diabolin wird durch mindestens einen von Diabolin verschiedenen Faktor (mit)verursacht.

3. Die Sensitivität der Zellen gegenüber Diabolin nimmt mit steigender Zelldichte stark ab.

4. Die Sensitivität von Gliomazellen C6-BU-1 für Diabolin ist auch nach neuntägiger Kulturdauer unter serumfreien Bedingungen nicht beeinträchtigt.

5. Die Hemmwirkung von Diabolin beruht nicht auf einer Wechselwirkung des Hemmstoffs mit dem stimulierenden Hormon selbst.

3.2. Biologische Charakterisierung

Das Serum eines Patienten mit nicht resezierbarem Hypophysenvorderlappen-Tumor (totale Vorderlappeninsuffizienz) weist einen deutlich niedrigeren Spiegel von Diabolin auf als das Serum eines an Acromegalie leidenden Patienten oder Kontrollmischserum (Wagner, 1978). Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß auch ein von T.Glaser gefundener Zellfaktor (Glaser, 1981), der ebenfalls den hormonell stimulierten intrazellulären cyclo AMP-Anstieg in Gliomazellen unterdrückt, mit Diabolin nicht identisch sein kann (Wagner, 1978). Wesentliche Kriterien dabei sind Löslichkeit in TCE, Dialysierbarkeit und fehlende Sensitivität gegenüber Alkalischer Phosphatase (Kap. 3.8.1.2.1.).

3.2.1. Aufnahme bzw. Ausscheidung von Diabolin

Das allgemeine Transportmittel des Organismus, das Blutplasma, besitzt selbst keine eigene anabolische Aktivität. Sämtliche Bestandteile des Plasmas werden entweder mit der Nahrung aufgenommen oder aus den synthetisierenden Zellen sezerniert und im Blut gegebenenfalls modifiziert. Die Zusammensetzung der ohne Ausnahme löslichen Bestandteile des Plasmas schwankt erheblich, z.B. nach Nahrungsaufnahme oder im Streß. Serum ist deshalb eine äußerst ungünstige Ausgangsquelle für die Reindarstellung eines Faktors.

Eine monatlich sich verlängernde Reihe von Faktoren (Varon & Adler, 1982) wird von verschiedenen Zellinien in ihr Kulturmedium entlassen. Gelingt es, eine Zellinie zu finden, die Diabolin in ausreichender Menge unter serumfreien Bedingungen in ihr Anzuchtmedium ausschüttet (Arenander & deVellis, 1980), ist bereits ein wesentlicher Vorreinigungsschritt getan. Die Vorteile dieser höchst effektiven "Anreicherung" eines Faktors in einem serumfreien Mediumüberstand könnten bei weitem den der quasi unbeschränkten Verfügbarkeit von Serum als Ausgangsmaterial überwiegen.
Weder die Gliomazellinie C6-BU-1 (Abb.8) noch die Leberzellinie BRL-3C4 (Daten nicht gezeigt) scheiden meßbare Mengen an Diabolin in ihr Anzuchtmedium aus. Zumindest im Falle der Konditionierung mit Leberzellen ändert sich daran auch nichts, wenn im serumfreien Medium zusätzlich Serumalbumin [3 %(w/v) fap-HSA] zugegen ist (Gliomazellen wurden unter diesen Bedingungen nicht getestet).

Der Verlust an Diabolinaktivität nach Vorinkubation des Serums mit Gliomazellen ist im Gegensatz zu Berichten in der Literatur (Hsu & Brooker, 1977) nur sehr gering (Abb.8). Man kann daraus jedoch nicht schließen, daß Diabolin von beiden Zellinien prinzipiell nicht gebildet oder nicht ausgeschüttet wird. Es wäre denkbar, daß die Bildung und/oder Ausschüttung von Diabolin durch exogene Faktoren reguliert wird.
Aufgrund der relativen Insensitivität des biologischen Testsystems kann jedoch nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden, daß die Zellen Diabolin aufnehmen (Abb.8). Letzteres ist allerdings aufgrund quantitativer Abschätzungen (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.5.1.) nicht wahrscheinlich und könnte aus den gleichen Über-

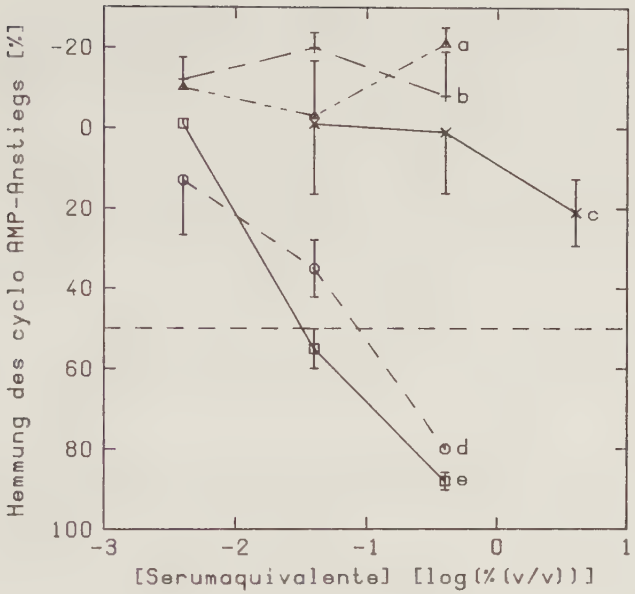


Abb. 8: Einfluß der Konditionierung serumhaltigen und serumfreien Anzuchtmediums durch Gliomazellen C6-BU-1 auf den Diabolingehalt des Mediums (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.5.1.).

Kurve a: Kontrolle: SF-Medium + fap-HSA

Kurve b: SF-Medium nach Zellkontakt + fap-HSA

Kurve c: Kontrolle: fap-HSA

Kurve d: FCS-Medium (90 %(v/v) DMEM/10 %(v/v) FCS) nach Zellkontakt

Kurve e: Kontrolle: FCS-Medium (90 % (v/v) DMEM/ 10 %(v/v) FCS)

legungen heraus auch unter keinen Umständen als Erklärung für die geringere Sensitivität der Testzellen bei höherer Zelldichte (Kap. 3.1.3.3.) herangezogen werden. Eine Aufnahme von Diabolin in die Zellen als Teil des Wirkmechanismus dieses Hemmstoffes ist aufgrund kinetischer Daten (Kap. 3.9.4. und 3.9.5.) unwahrscheinlich. Eine Klärung dieser Frage wird Versuchen mit radioaktiv markiertem Diabolin vorbehalten bleiben.

3.2.2. Bindung und Aktivierung durch Proteine

Diabolin bindet ausgezeichnet an Proteine verschiedener Provenienz. Genauer untersucht wurde seine Bindungsfähigkeit an Serumalbumin, von dem bekannt ist, daß es für eine Reihe von lipophilen Substanzen mehrere zum Teil hochaffine Bindungsstellen besitzt (Goodman, 1958; Spector et al., 1969).

3.2.2.1. Serumalbumin

Die Bindung von Diabolin an Serumalbumin (McMenamy & Lee, 1967) ist so effektiv, daß viele kommerziell im Handel befindlichen kristallisierten BSA- bzw. HSA-Präparationen (Cohn et al., 1947; Teresi & Luck, 1952) eine dem Diabolin vergleichbare Hemmaktivität aufweisen (Daten nicht gezeigt).
Lediglich eine speziell fettsäureverarmte, kommerziell erhältliche HSA-Präparation (bzw. seit kurzem auch eine entsprechende BSA-Präparation) zeigt nur noch eine schwache

Hemmaktivität auf die hormonelle Stimulierbarkeit von Gliomazellen (Abb.9).

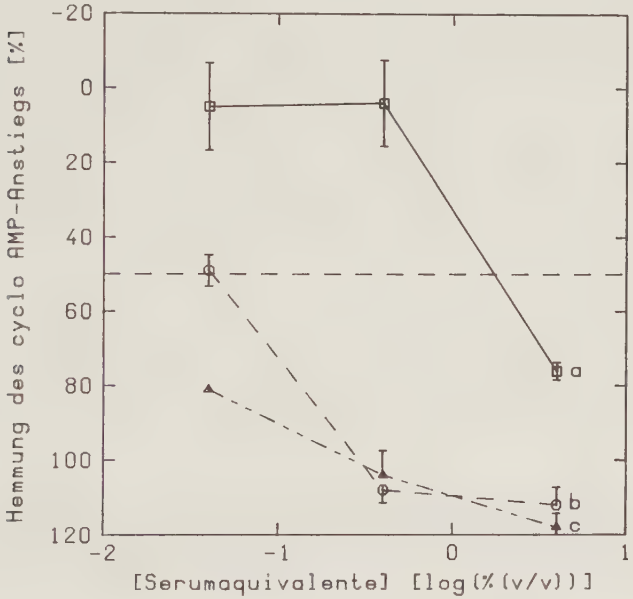


Abb. 9: Hemmaktivität zweier kommerziell erhältlicher Präparationen menschlichen Serumalbumins.

Kurve a: Serumalbumin, verarmt an Fettsäuren
[≡ fap-HSA 6 %(w/v)]
Fa. SIGMA; München, Bestellnr.: A-1887

Kurve b: Serumalbumin, verarmt an Globulinen
[6 %(w/v)]
Fa. SIGMA, München, Bestellnr.: A-8763

Kurve c: Kontrolle: Acetonpulver in PBS (Seq)

Wichtig ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen, daß viele Laboratorien zur Stabilisierung hochempfindlicher Substanzen diese in einer 0.1 %(w/v) BSA-Lösung konservieren. Wird dann der Einfluß dieser Substanzen z.B. auf den intrazellulären cyclo AMP-Spiegel untersucht und die gefundenen Effekte ohne weitere Kontrollen den zu stabilisierenden Molekülen zugeschoben (Anderson et al., 1979a), so sind diese Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren. Das gleiche gilt für Faktoren, die in mehreren Proteingipfeln gleichzeitig auftreten und die cyclo AMP-Anhäufung unterdrücken (Anderson et al., 1979c), bzw. für Faktoren mit der gleichen Eigenschaft, die aus Plasma lediglich angereichert werden (Tell et al., 1973).

Befreit man jedoch eine kommerzielle, diabolinhaltige HSA-Präparation nach einer beschriebenen Methode (Chen, 1967) weitgehend von Fettsäuren, so führt das zu einem Verlust an Hemmaktivität von mehr als eineinhalb Größenordnungen (Daten nicht gezeigt).

Diese Befunde legen nahe, daß es sich bei Diabolin möglicherweise um ein Molekül handeln könnte, das sich zusammen mit den Fettsäuren von Serumalbumin abtrennen läßt, also gewisse strukturelle Ähnlichkeiten mit jenen aufweisen sollte.

Wird Diabolin seines Trägerproteins entblößt (Kap. 3.5.1.1.), so verliert es seine biologische Aktivität. Diese kann jedoch durch Zusatz von Serumalbumin wieder quantitativ zurückgewonnen werden (Abb.10).

Für die Reaktivierung der biologischen Aktivität wird in diesem wie in allen folgenden Experimenten die vorher erwähnte, weitgehend an Fettsäuren verarmte, HSA-Präparation (= fap-HSA) verwandt. Entsprechend der Konzentration von

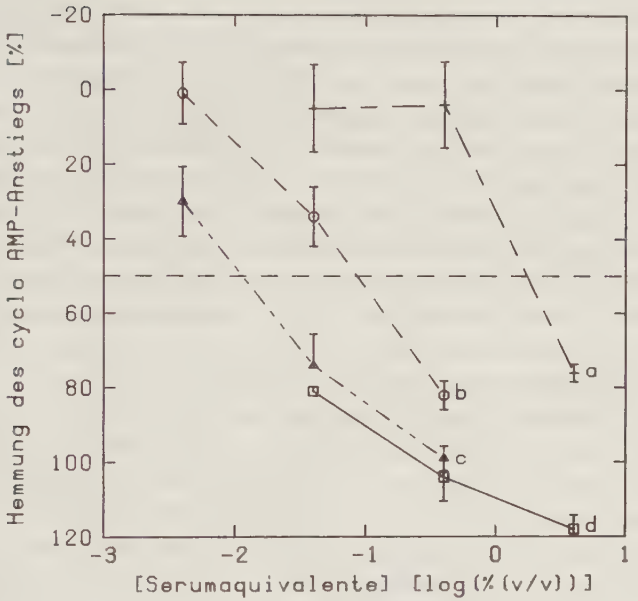


Abb. 10: Einfluß von Serumalbumin auf die biologische Hemmaktivität von Diabolin (experimentelle Einzelheiten unter 7.3.3.).

Kurve a: Kontrolle: fap-HSA [6 %(w/v)]

Kurve b: proteinfreies Diabolin (Kap. 3.5.1.1.)

Kurve c: Diabolin nach Bindung an fap-HSA [6 %(w/v)]

Kurve d: Kontrolle: Acetonpulver in PBS (Seq)

Serumalbumin im menschlichen Blut wird dazu jeweils eine Lösung von 6 %(w/v) fap-HSA in PBS (Endkonzentration) benutzt. Auch geringere fap-HSA-Konzentrationen als 6 %(w/v) scheinen zur vollständigen Reaktivierung der Diabolinaktivität zu genügen (Daten nicht gezeigt). Da aber eine geeignete chemische Quantifizierungsmethode für Diabolin bisher nicht bekannt ist, können à priori keine Angaben über den Gehalt einer zu untersuchenden Lösung an Diabolin gemacht werden. Aus diesem Grund wird Diabolin routinemäßig mit einer festgelegten Konzentration von fap-HSA reaktiviert.
Näheren Einblick in die Bindungsverhältnisse und -stöchiometrie wird eine genaue Analyse der von Diabolin im HSA benutzten Bindungsstelle(n) erbringen.
Nach einer derartigen Reaktivierung (experimentelle Einzelheiten unter 7.3.3.) ist die Bindung von Diabolin an fap-HSA wieder so fest, daß Diabolin quantitativ im lyophilisierten Niederschlag einer anschließenden Acetonfällung gefunden wird (Abb.11).

Das bisher noch unverzichtbare biologische Testsystem zur Quantifizierung der Hemmaktivität von Diabolin ist jedoch zu insensitiv, um Reaktivierungskinetiken mit fap-HSA oder entsprechende Temperaturabhängigkeiten im Detail zu verfolgen. Die maximale Diabolinaktivität wird nach einer Reaktivierungsdauer von 20 min und einer Inkubationstemperatur von 45 ^{o}C gemessen (Daten nicht gezeigt).
Auch dieses Problem kann sinnvollerweise erst angegangen werden, wenn der gereinigte Faktor radioaktiv markiert werden kann.

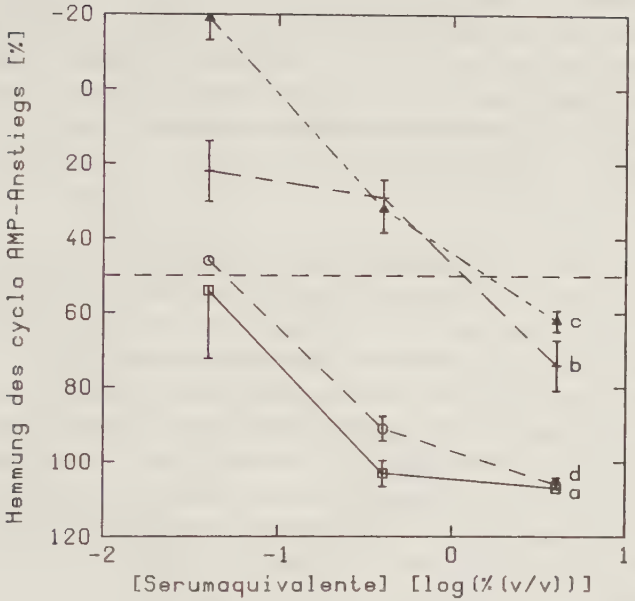


Abb. 11: Aktivitätsverteilung nach einer Acetonfällung von reaktiviertem Diabolin (experimentelle Einzelheiten unter 7.3.2. und 7.3.3.).

Diabolinpräparat: Methanoleluat der Kieselgelsäule (Kap. 3.5.1.2.)

Kurve a: Kontrolle: Diabolin + fap-HSA

Kurve b: Kontrolle: fap-HSA

Kurve c: Überstand der Acetonfällung + fap-HSA

Kurve d: Niederschlag der Acetonfällung.

3.2.2.2. Bindung an andere Proteine

Wie später gezeigt werden wird, besitzt Diabolin im Serum kein spezifisches Trägerprotein (Kap. 3.6.3.2.). Es ist deshalb auch zu erwarten, daß Diabolin durch verschiedene Proteine zur vollen biologischen Aktivität reaktiviert werden kann. Diabolin aus menschlichem Serum kann z.B. durch Bindung an Rinder-Immunglobulin G vollständig, durch Bindung an Hühneralbumin partiell reaktiviert werden (Tab.3).

Es liegt nahe zu vermuten, daß noch eine Reihe weiterer Proteine diese Eigenschaft zeigen. Ist das der Fall, wäre es interessant, die physiologische Bedeutung des Träger- bzw. Aktivatorproteins zu untersuchen. Eine systematische Screening-Analyse möglicher Reaktivierungsproteine/-peptide könnte Aufschluß darüber geben, ob zur Bindung an und/oder zur Reaktivierung durch ein Akzeptormolekül z.B. eine Mindestgröße der Peptide oder bestimmte Strukturelemente in den Proteinen notwendig sind. Besonders hilfreich wäre in diesem Zusammenhang eine funktionelle Trennung von Bindung und Reaktivierung, was wiederum nur über eine radioaktive Markierung von Diabolin nachzuweisen wäre.

3.2.3. Calcium-Abhängigkeit

Die Stimulierbarkeit der cyclo AMP-Bildung in 108CC15--Hybridzellen wird durch Calciumionen reguliert (Brandt, 1980). Zusatz von Calciumionen zum Inkubationsmedium (bis 18 mmol/l) hat jedoch keinerlei meßbaren Einfluß, weder auf die erzielbare Grundstimulation, noch auf den Hemmeffekt von Diabolin (Wagner, 1978).

Tab. 3: Reaktivierung von proteinfreiem Diabolin mit Proteinen verschiedener Herkunft (experimentelle Einzelheiten unter 7.3.3.).

Diabolinpräparat: Methanoleluat der Kieselgelsäule (Kap. 3.5.1.2.)

Trägerprotein	Proteinkonzentration [mg/ml]	Diabolin zugegen	Hemmaktivität [bu/ml]
-	-	+	233
nativ	80	+	4200
fap-HSA	60	-	129
fap-HSA	60	+	3300
IgG (Rind)	30	-	382
IgG (Rind)	30	+	3480
Ovalbumin (Huhn)	50	-	376
Ovalbumin (Huhn)	50	+	1720

Tab. 4: Einfluß von Calciumionen-Entzug auf Grundstimulation und Diabolinwirkung in Gliomazellen C6-BU-1 (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.4.4.)

Diabolinpräparat: Acetonpulver in PBS (Seq)

Dialyse des Serums gegen EGTA-Lösung [5 mmol/l]	Ca^{2+} im Inkubationsmedium [mmol/l]	Grundstimulation [pmol cAMP/mg Protein]	Diabolinkonzentration [bu/ml]	[%]
-	1.8	1200 ± 92	25000	100
-	0	819 ± 77	22200	89
+	0	819 ± 77	22300	89

Dies gilt umgekehrt auch für die weitgehende Komplexierung aller zweiwertigen Ionen durch EGTA im Serum, bei gleichzeitigem Ausschluß von Calciumionen im Inkubationsmedium der Testzellen (Tab.4) (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.4.4.). Eine Beteiligung von Calciumionen am Mechanismus der Hemmwirkung von Diabolin kann damit ausgeschlossen werden.

Völlig analoge Daten werden mit EDTA (10 mmol/l) als Chelator erhalten (Daten nicht gezeigt). Die geringe Abnahme der Grundstimulation bei Ca^{2+}-Mangel ist auf das dreimalige Waschen des Zellrasens mit Medium zurückzuführen.

3.2.4. Zusammenfassung

1. Diabolin wird unter Kulturbedingungen weder von Gliomazellen C6-BU-1 noch von Leberzellen BRL-3C4 ins Anzuchtmedium abgegeben. Eine Aufnahme von Diabolin in die Zellen ist sehr unwahrscheinlich.

2. Weder ein Überschuß noch die Abwesenheit von Calciumionen im Testsystem haben einen Einfluß auf die Hemmwirkung von Diabolin.

3. Diabolin bindet unspezifisch aber hochaffin an Serumalbumin. Die Bindung erfolgt z.B. auch an Immunglobulin und Ovalbumin.

4. Diabolin wird als Verunreinigung in vielen kommerziell erhältlichen Serumalbumin-Präparationen gefunden.

5. Diabolin zeigt nur in proteingebundenem Zustand seine volle biologische Aktivität.

6. Diabolin kann von Proteinen verschiedener, auch klassenfremder, Herkunft und unterschiedlichen Molekulargewichts reaktiviert werden.

3.3. Quellenspezifität

Zur Isolierung eines unbekannten Faktors benötigt man ausreichende Mengen Ausgangsmaterial von möglichst hoher spezifischer Aktivität. Aus diesem Grund und um erste Hinweise auf die mögliche biologische Bedeutung von Diabolin zu erhalten, wurden Versuche zum Auffinden geeigneter Materialquellen durchgeführt.

3.3.1. Säugerplasmen

In den Seren aller bisher untersuchten Säugetierarten (Daten nicht gezeigt, siehe auch van Calker, 1977; Wagner, 1978) wird ohne Ausnahme eine vergleichbare Konzentration an Diabolin gefunden. Dabei besteht kein Unterschied in der Hemmaktivität zwischen Serum, ACD- und Heparin-Plasma (Wagner, 1978). Die Wirkung der Seren verschiedener Spezies komplementieren sich wechselseitig zur gleichen Maximalhemmung (Wagner, 1978). Es liegt deshalb - zumindest was seine Hemmwirkung angeht - keine Artspezifität von Diabolin vor. Man muß daraus schließen, daß Diabolin, oder ein Agens vergleichbarer Wirkung, während der Evolution stabil geblieben ist und diesem Prinzip mit hoher Wahrscheinlichkeit eine biologische Bedeutung zukommen muß.
Es wäre denkbar, daß die Hemmwirkung erst bei der Gewinnung von Serum bzw. Plasma aus den zellulären Bestandteilen freigesetzt wird, sei es durch die bei der Blutentnahme durch Unterdruck unvermeidbare geringe Lyse der Erythrocyten oder der anderer Blutzellen später bei der Serumgewinnung.

Werden beide artifiziellen Bedingungen jedoch vorsätzlich induziert, so zeigt sich, daß keines der Lysate eine Hemmwirkung aufweist (Daten nicht gezeigt).
Man muß daraus schließen, daß Diabolin auch unter in vivo-Bedingungen löslicher Bestandteil des Blutplasmas ist, vorausgesetzt, die Freisetzung aus den Blutzellen kann nicht exogen induziert werden. Von diesen Bestandteilen zeigen die isolierten Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X keine nennenswerte Hemmaktivität (Daten nicht gezeigt).
Bei der kommerziellen Auftrennung von Serum an einem Stärkeblock (Behringwerke AG, Marburg, experimentelle Einzelheiten nicht bekannt) werden 16 Fraktionen erhalten, die zwischen 10 und 114 mg Protein/ml enthalten. Die proteinnormierte Hemmaktivität von Diabolin ist auf alle Fraktionen verschmiert (Daten nicht gezeigt). Es ist deshalb bis jetzt nicht möglich, auf industriell vorgereinigte Serumpräparate als Ausgangsmaterial zurückzugreifen.

3.3.2. Vögelplasmen

Im Gegensatz zu den kernlosen Erythrocyten der Säugetiere besitzen die kernhaltigen roten Blutkörperchen der Vögel eine hormonell stimulierbare Adenylatcyclase. Die Blutplasmen von Truthahn, Taube und Ente zeigen eine, verglichen mit Säugetierplasmen deutlich verringerte Diabolinaktivität (Tab.5). Diese reicht aber unter den in vitro-Testbedingungen bei weitem aus, um die hormonell stimulierte cyclo AMP-Anhäufung vollständig zu unterbinden (Daten nicht gezeigt).

Tab. 5: Diabolingehalt im Blut dreier Vogelarten im Vergleich zu menschlichem Serum.

Spezies	Blutbestandteil	Diabolinkonzentration [bu/ml]	[%]
Mensch	Serum	20300	100
Taube	Plasma	1820	9
Ente	Plasma	1420	7
Truthahn	Plasma	2310	11
Truthahn	Serum	2390	12

Dieser Befund muß jedoch nicht bedeuten, daß die Adenylatcyclase der Vogelerythrocytenmembran unter physiologischen Bedingungen inaktiv wäre. Zum einen nämlich ist der Serumeffekt auf die Erythrocyten-Cyclase der Vögel bisher nicht untersucht, zum anderen ist es möglich, daß die Sensitivität der Zellen gegenüber Diabolin, in Analogie zu den Befunden in Zellkultur bei Kultivierung der Zellen in Gegenwart von Serum, deutlich erniedrigt ist (Kap. 3.1.3.1.). Eine denkbare biologische Bedeutung für Diabolin in diesem System könnte in der Aufrechterhaltung einer gewissen Art von "Rauschsperre" gegenüber den im Blut transportierten stimulierenden Hormonen bestehen.

3.3.3. Andere Körperflüssigkeiten

Colostrum kann im Zellkulturmedium von Epithelzellen das Serum ersetzen (Klagsbrun, 1980). Bereits früher wurde

jedoch gezeigt, daß weder Milch noch Urin einen Hemmeffekt auf die hormonell stimulierbare cyclo AMP-Anhäufung besitzen (Wagner, 1978). Das gleiche gilt für menschlichen Speichel (Daten nicht gezeigt) und überraschenderweise auch für die Cerebrospinalflüssigkeit [Mensch](Abb.12). Andererseits werden dem Serumgehalt vergleichbare Mengen an Hemmaktivität in der Lymphe [Maus] gefunden (Abb.12).
Über die Lymphbahn werden die meisten Fette vom Darm direkt zur Leber unter Umgehung des Blutstroms transportiert.

Inwieweit der Hemmeffekt der Lymphe und der des Serums vergleichbar oder gar identisch ist, läßt sich aufgrund der vorliegenden Experimente nicht entscheiden. Man muß nämlich damit rechnen, daß die Gegenwart großer Mengen Lipide im Inkubationsmedium, wie es bei den Versuchen mit Lymphe immer der Fall ist, einen unspezifischen, in aller Regel störenden Einfluß auf die Plasmamembran ausübt (Frenkel et al., 1980).

3.3.4. Zellextrakte

Gelingt es, Diabolin bereits an seinem möglichen Syntheseort in den Zellen abzufangen, bevor es sich mit dem Serum mischt, könnten Einblicke in seine Biosynthese gewonnen werden. Darüberhinaus wäre in diesem Fall eine Isolierung in aller Regel einfacher, da im ersten Reinigungsschritt sofort membrangebundene von löslichen Bestandteilen getrennt werden können. Aus diesem Grund wurden die Versuche mit Zellextrakten durchgeführt.

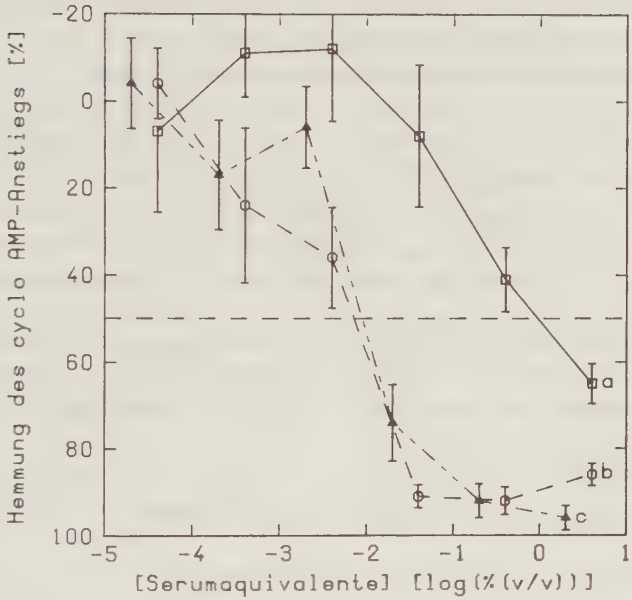


Abb. 12: Hemmaktivität von Liquor und Lymphe auf den hormonell stimulierten intrazellulären cyclo AMP-Spiegel in Gliomazellen C6-BU-1.

Ein Milliliter Liquor bzw. Lymphe wird willkürlich einem Milliliter Serum gleichgesetzt.

Kurve a: Liquor [Mensch] (0.36 mg Protein/ml) + fap-HSA

Kurve b: Lymphe [Maus] (21 mg Protein/ml) + fap-HSA

Kurve c: Acetonpulver (Kaninchenserum) in PBS (77 mg Protein/ml).

Es zeigt sich, daß weder die Extrakte aus polyploiden Gliomazellen C6-4-2 noch die aus Leberzellen BRL-3C4 (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.5.2.) eine nennenswerte Hemmaktivität aufweisen (Tab. 6).

Tab. 6: Hemmaktivität der Extrakte zweier Zellinien nach Reaktivierung mit fap-HSA. (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.5.2.)

Quelle mutmaßlicher Hemmaktivität	Diabolinaktivität	
	[bu/ml]	[%]
Humanserum (Kontrolle)	4300	100
Gliomazellen C6-4-2*	594	14
Leberzellen BRL-3C4	549	13

* (Heumann, 1978; Heumann et al., 1982)

Diese Daten zeigen, daß weder die Glioma- noch die Leberzellinie als zu Serum alternatives Ausgangsmaterial für die Diabolingewinnung in Frage kommt, insbesondere wenn die Kosten und der technische Aufwand für die Zellkulturtechnik im kleintechnischen Maßstab bedacht werden. Man kann aufgrund der Ergebnisse dieser Versuche jedoch nicht ausschließen, daß die extrahierten Zellen als Syntheseort einer zu postuliernden, noch inaktiven Vorstufe in Frage kommen könnten.
Weiterhin ist aufgrund der experimentellen Einzelheiten der Extraktgewinnung (Kap. 7.4.5.2.) auszuschließen, daß die diabolische Hemmung durch Plasmamembranfetzen oder entsprechende Lipidvesikel verursacht wird (Liebermann et al., 1980).

3.3.5. Zusammenfassung

1. Diabolin wird in den Blutseren aller bisher untersuchten Säugetiere in vergleichbaren Mengen gefunden. Die Blutplasmen der Vögel weisen einen im Vergleich deutlich niedrigeren Spiegel an Hemmaktivität auf.

2. Weder Milch, Urin, Speichel oder Liquor enthalten nennenswerte Mengen an Diabolin.

3. Lymphe weist zwar eine dem Serum vergleichbare Hemmaktivität auf, es bleibt aber offen, ob diese Hemmung von Diabolin hervorgerufen wird.

4. Zellextrakte aus polyploiden Gliomazellen bzw. aus Leberzellen zeigen keine Hemmaktivität.

3.4. Wirkortspezifität

Diabolin wirkt hemmend (van Calker, 1977) auf die hormonell stimulierbare cyclo AMP-Synthese in Ratten--Gliomazellen C6-BU-1 (Amano et al., 1974), in Ratten--Glioma x Mäuse-Neuroblastoma-Hydbridzellen 108CC15 (Hamprecht, 1974 und 1977), sowie in Primärkulturen aus Gehirnen perinataler Mäuse bzw. Ratten (van Calker & Hamprecht, 1980). Außerdem wird über Hemmeffekte von Serum auf die nichttransformierte Fibroblastenlinie WI 38 berichtet (Bashor & Saier, 1976).
Da die Zellen des Zentralnervensystems, an denen die Hemmwirkung von Diabolin erstmals entdeckt wurde, unter physiologischen Bedingungen mit Plasma nicht in Kontakt kommen, ist es wichtig zu wissen, ob auch Zelltypen der Peripherie als möglicher physiologischer Wirkort von Diabolin in Frage kommen. Aus diesem Grund wurden entsprechende Versuche mit Leberzellen durchgeführt.
Diabolin hemmt die durch L-Isoproterenol (0.2 mmol/l) stimulierte intrazelluläre cyclo AMP-Anhäufung in Leberzellen analog zu den Verhältnissen im Zentralnervensystem (Abb.13). Da bisher nichts über adrenerge α-Rezeptoren auf diesen Zellen bekannt ist, wird in diesen Versuchen anstelle des sonst verwandten L-Noradrenalins der spezifische Agonist des adrenergen ß-Rezeptors als Hormon eingesetzt.

Auch die Erhöhung der Sensitivität gegenüber Diabolin bei Anzucht der Leberzellen in Abwesenheit von Serum (Abb.13) entspricht sowohl qualitativ als auch quantitativ den Befunden an Gliomazellen (Kap. 3.1.3.1.). Der Serumgehalt

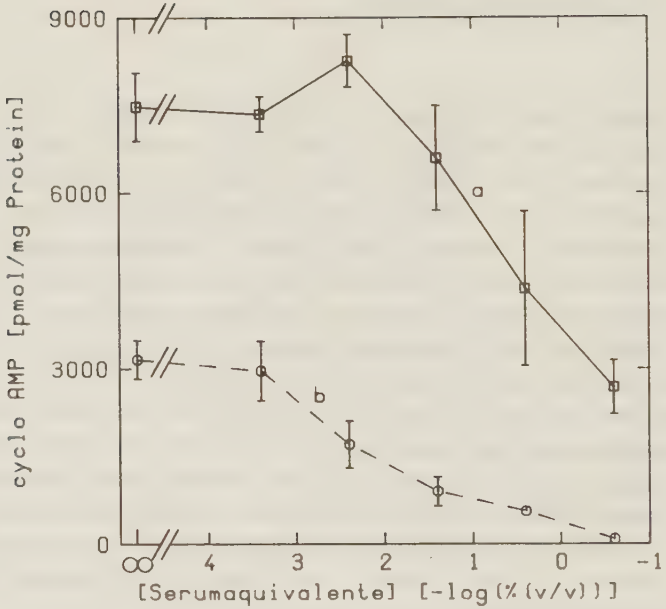


Abb. 13: Einfluß der Anzuchtbedingungen auf die hormonelle Stimulierbarkeit [0.2 mmol/l L-Isoproterenol] und ihre Hemmung durch Diabolin in der Leberzellinie BRL-3C4. Diese Ergebnisse werden ohne Verwendung eines Phosphodiesterase-Hemmers erzielt.

Passage: n + 6 (siehe Kap. 7.2.4.)

Zellprotein/Schale: 156 ug (FCS)
17 ug (SF)

Diabolinpräparat: reaktivierter Methanolextrakt aus Acetonpulver (Kap. 7.4.1.14.)

Kurve a: Anzucht in FCS-Medium [95 %(v/v) DMEM/ 5 %(v/v) FCS]

Kurve b: Anzucht in SF-Medium.

des Anzuchtmediums hat jedoch im Leberzellsystem einen dramatischen Einfluß auf die ungehemmte Grundstimulation. Während die Gliomazellen auf Serumentzug mit einem Verlust an hormoneller Stimulierbarkeit von etwa 30 % reagieren (Kap. 3.1.3.1.), errechnet sich die entsprechende Verminderung im Leberzellsystem zu mindestens dem Doppelten, verglichen mit der Grundstimulation nach Anzucht der Zellen in serumfreiem Medium.
Serumentzug führt bei Leber- wie Gliomazellen zu einer Hemmung der Proliferation, jedoch bei den Leberzellen gleichzeitig zu einer nur sehr schwachen morphologischen Differenzierung (durch Augenschein).
Nicht zuletzt wegen der vergleichsweise schlechten Anheftung und der schwierigen technischen Handhabung der Leberzellen (Tab.7), werden alle weiteren Versuche an den Rattengliomazellen C6-BU-1 durchgeführt.

Die weitere Verwendung von Zellen des Zentralnervensystems als Testsystem zur Anreicherung und Charakterisierung von Diabolin ist gerechtfertigt, da lipophile Substanzen die Blut-Hirn-Schranke (Hjelle et al., 1978) jederzeit durchdringen können, zum anderen aber der Hemmeffekt von Diabolin auf die hormonell stimulierbare cyclo AMP-Bildung in der Hirntraumatologie eine große Rolle spielen muß.

Tab. 7: Vergleich des Einflusses von Serumentzug über 48 h auf die - für ihre Eignung als biologisches Testsystem wichtigen - Eigenschaften von Leber- und Gliomazellen.

Eigenschaft	Auswirkung von Serumentzug auf	
	Gliomazellen C6-BU-1	Leberzellen BRL-3C4
Verlust an hormoneller Stimulierbarkeit	30 %	60 %
Hemmung der Proliferation	ausgeprägt	ausgeprägt
Induktion von Differenzierung	ausgeprägt	schwach
Anheftung am Plattenboden	vollständig	partiell
Anheftungsgeschwindigkeit	geringfügig kleiner als in Gegenwart von Serum	stark erniedrigt

3.5. Anreicherung

Wie bereits mehrfach erwähnt, fällt Diabolin aus Serum quantitativ in den Niederschlag einer Acetonfällung des Serums (Wagner, 1978). Das ändert sich auch nicht, wenn der in PBS aufgenommene Niederschlag einer nochmaligen Fällung durch Aceton unterworfen wird (Daten nicht gezeigt). Beide in diesem Kapitel beschriebenen Anreicherungsmethoden benutzen das Acetonpulver aus Humanserum als Ausgangsmaterial.
Im Vertrauen auf publizierte Daten über Diabolin sowie aufgrund eigener Befunde zu seinem Dialyseverhalten wie auch zu seinem Verhalten gegenüber Aceton und Ammoniumsulfat (Kap. 3.6.1.) wurde lange Zeit vermutet, es handle sich bei Diabolin um ein, wenn auch in mancher Hinsicht ungewöhnliches, Protein. Erst die Revision dieser Arbeitshypothese (Kap. 3.8.2.) führte zu zwei Anreicherungsmethoden (Schema Abb. 26, S. 81).

3.5.1. Zerstörung des Trägerproteins

3.5.1.1. Behandlung mit Proteinase K

Proteinase K aus Pilzen ist wohl das effektivste der z.Zt. verfügbaren Proteasengemische. Inkubiert man in PBS gelöstes Acetonpulver mit Proteinase K über 24 h (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.2.1.), beendet die Enzymeinwirkung durch Zusatz von SDS und trennt das Gemisch unter denaturierenden Bedingungen auf einem Polyacrylamid-Plattengel elektrophoretisch auf, so

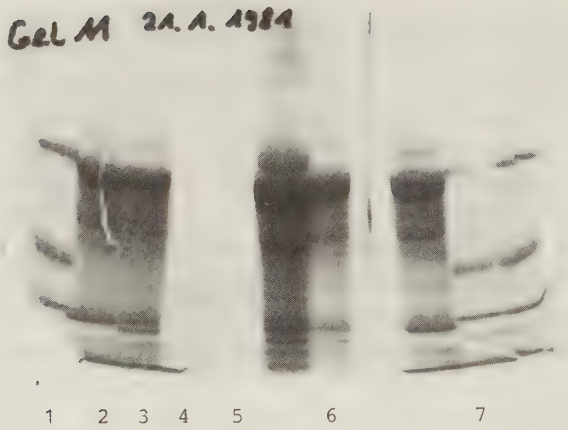


Abb. 14: Auftrennung von proteaseverdautem Serum auf einem Polyacrylamid-Gel unter protein-denaturierenden Bedingungen (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.5.3.).
Anfärbung mit Coomassie-Blue (Original hinterlegt).

Spur 1: Molekulargewichtsstandards:

Phosphorylase a	95 kg/mol
Ovalbumin	45 kg/mol
Aldolase	40 kg/mol
Chymotrysinogen	27 kg/mol

Spur 2: unbehandeltes Serum

Spur 3: Serum-Kontrollinkubation (24 h, 37 °C)

Spur 4: Serum + Proteinase K [2 mg/ml] (24 h, 37 °C)

Spur 5: PBS + Proteinase K [2 mg/ml] (24 h, 37 °C)

Spur 6: Serum + Proteinase K [2 mg/ml] + SDS [0.02 % (w/v)] (24 h, 37 °C)

Spur 7: Molekulargewichtsstandards

erhält man nach Anfärbung mit Coomassie Brillant Blue den Nachweis, daß durch diese Behandlung sämtliches Protein hydrolysiert worden ist (Abb.14) (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.5.3.).

Die kleinsten Peptide werden dabei absichtlich elektrophoretisch aus dem Gel eluiert, um eine Anfärbung zu ermöglichen.
Die 24 lang ohne Zusätze inkubierte Serumprobe (Abb.14, Spur 3) unterscheidet sich vom unbehandelten Kontrollserum (Abb.14, Spur 2) lediglich durch eine zusätzliche Bande im Bereich niederer Molekularmasse, wobei die knapp darüberliegende Bande deutlich geschwächt ist. Diese Veränderungen des Bandenmusters während einer langdauernden Inkubation bei 37 ^{o}C sind wahrscheinlich durch eine partielle autokatalytische Proteolyse eines kleinen Proteins zu erklären.

In Spur 6 (Abb.14) wurde eine Serumprobe aufgetrennt, die zwar 24 h lang mit Proteinase K inkubiert, jedoch bereits zu Beginn der Inkubation durch Zusatz von SDS gestoppt wurde. Das Bandenmuster dieses Ansatzes unterscheidet sich, abgesehen von den schwachen zusätzlichen Banden durch die Proteinase selbst, nicht von dem der Kontrollinkubation (Abb.14, Spur 3) und liefert damit den Beweis, daß die zugesetzte Menge an SDS (Endkonzentration 0.02 %(w/v)) ausreicht, um die Proteaseaktivität zum Erliegen zu bringen. Letzteres ist bei Verwendung eines biologischen Testsystems unverzichtbar.

Obwohl nach 24 h Inkubation des Serums mit Proteinase K (2 mg/ml) sämtliches Serumprotein verdaut ist, ändert sich die Diabolinaktivität des Ansatzes nicht (Abb.15).

Die serumlose Kontrollinkubation der Protease selbst (Abb.14, Spur 5) hemmt maximal 15 % der Grundstimulation (Daten nicht gezeigt).

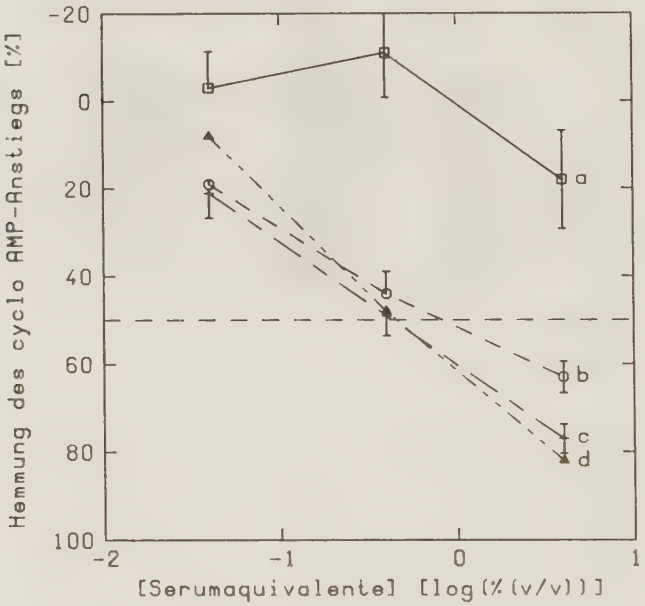


Abb. 15: Einfluß von Proteinase K-Behandlung (24 h, 37 °C) (2 mg/ml) auf die Hemmaktivität von Diabolin. Beendigung der Reaktion durch Zusatz von SDS (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.2.1.).

Diabolinpräparat: Acetonpulver in PBS (Seq)

Kurve a: Kontrolle: inaktivierte [0.02 %(w/v) SDS] Proteinase K (2 mg/ml)

Kurve b: Diabolin nach Proteinase K-Behandlung (2 mg/ml)

Kurve c: Kontrollinkubation: Diabolin (24 h)

Kurve d: Kontrolle: Diabolin

Bereits oben wurde gezeigt, daß Diabolin zur vollen Entfaltung seiner biologischen Hemmaktivität an Protein gebunden sein muß (Kap. 3.2.2.). Die nach vollständiger Verdauung aller Serumproteine weitgehend unbeschadete Hemmaktivität des Inkubationsansatzes (Abb.15) muß deshalb darauf zurückzuführen sein, daß das Proteasengemisch selbst als Trägerprotein fungiert. Um diese Annahme zu überprüfen (und aus finanziellen Gründen), werden die entsprechenden Versuche mit geringerer Enzymkonzentration wiederholt.

Reduziert man die proteolytische Aktivität auf ein Zehntel (Endkonzentration 0.2 mg/ml), so wird nach 24 h Inkubation nur noch eine sehr schwache (manchmal auch keine) Diabolinaktivität mehr gefunden (Abb.16), obwohl auch unter diesen Bedingungen alle Proteine verdaut werden (SDS-Gel; nicht gezeigt). Diabolin ist also in der Wahl seines Trägerproteins nicht besonders wählerisch. Das erklärt auch die Ergebnisse früherer Versuche (Wagner, 1978), daß in Gegenwart hoher Konzentrationen von Trypsin oder Chymotrypsin, trotz Verdauung der Serumproteine, die Diabolinaktivität erhalten bleibt.

Bemerkenswert ist außerdem, daß sich Diabolin unter diesen Bedingungen wieder einmal wie ein Protein verhält und somit seinem Namen gerecht wird.

Unterbricht man die Proteaseaktivität (0.2 mg/ml) nicht durch Zusatz von SDS, sondern beendet die Inkubation durch eine anschließende Acetonfällung, so verbleibt Diabolin quantitativ im Acetonüberstand. Es zeigt jedoch ohne Trägerprotein nur eine sehr geringe Hemmaktivität (Abb.10). Setzt man diesem Überstand aber erneut Protein

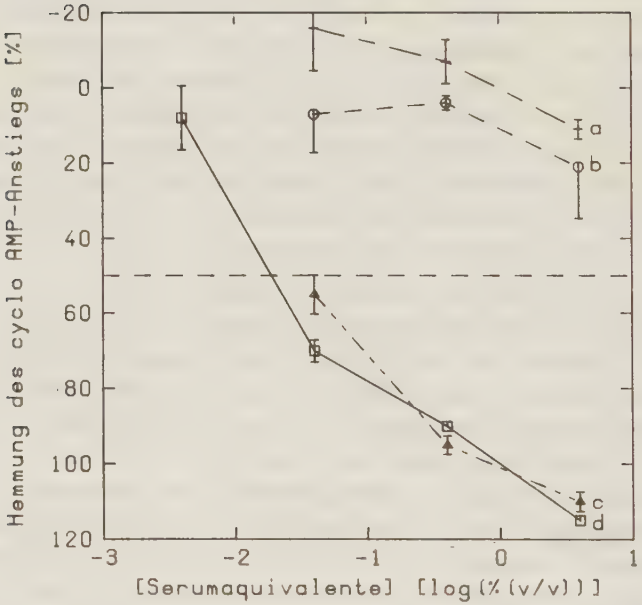


Abb. 16: Einfluß der Proteinase K-Menge bei der Behandlung von Diabolin auf seine Hemmaktivität im Niederschlag einer abschließenden Acetonfällung (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.2.1.).

Diabolinpräparat: Acetonpulver in PBS (Seq)

Kurve a: Kontrolle: Proteinase K (2 mg/ml)

Kurve b: Diabolinaktivität nach Behandlung von Acetonpulver mit Proteinase K (0.2 mg/ml)

Kurve c: Diabolinaktivität nach Behandlung von Acetonpulver mit Proteinase K (2 mg/ml)

Kurve d: Kontrollinkubation: Diabolin

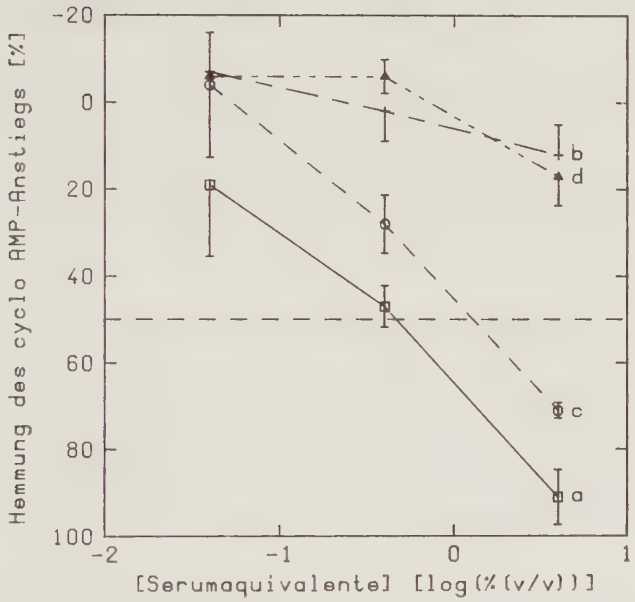


Abb. 17: Aktivitätsverteilung von Diabolin nach einer Acetonfällung, die die Verdauung von reaktiviertem Diabolin mit Proteinase K (0.2 mg/ml) beendet.

Diabolinpräparat: Methanoleluat aus einer Kieselgelplatte (Kap. 3.6.3.4.)

Kurve a: Kontrolle: Diabolin + fap-HSA

Kurve b: Kontrolle: fap-HSA

Kurve c: Überstand nach Acetonfällung + fap-HSA

Kurve d: Niederschlag nach Acetonfällung + fap-HSA

zu, so wird die Diabolinaktivität wieder vollständig zurückgewonnen. Die Daten eines solchen Reaktivierungsexperiments wurden bereits in anderem Zusammenhang (Kap. 3.2.1.) gezeigt (Abb.10).

Durch fap-HSA reaktiviertes Diabolin wird zusammen mit dem Trägerprotein durch Aceton wieder vollständig gefällt. Aus diesem Niederschlag kann Diabolin erneut durch Behandlung mit Proteinase K und anschließender Acetonfällung wie oben freigesetzt werden (Abb.17).

3.5.1.2. Trennung auf einer Kieselgelsäule

Die Tatsache, daß sich proteinfreies Diabolin in der organischen Phase einer Acetonfällung wiederfindet, läßt den Schluß zu, daß es sich bei Diabolin entweder um ein verhältnismäßig kleines, oder aber um ein lipophiles Molekül handeln muß.

In vielen Fällen gelingt eine effektive Auftrennung lipophiler Substanzen durch Chromatografie an Kieselgel mit Lösungsmitteln verschiedener Polarität (Hirsch & Ahrens, 1958).

Wird der Rückstand der Oberphase einer Acetonfällung (nach Proteinverdauung) in Chloroform aufgenommen, auf eine Kieselgelsäule aufgetragen und stufenweise mit Chloroform, Aceton und Methanol eluiert (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.4.), so ergeben sich drei Fraktionen, die nach Reaktivierung mit fap-HSA unterschiedliche Hemmaktivitäten zeigen (Abb.18).

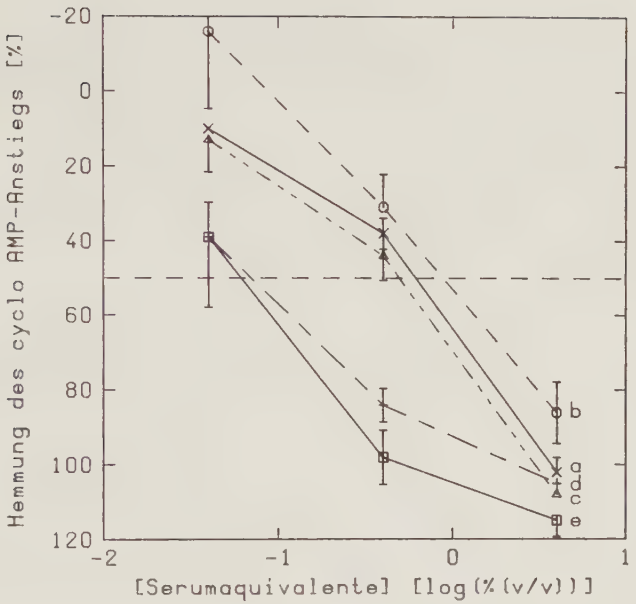


Abb. 18: Einfluß der Lösungsmittelpolarität auf die Rückgewinnung von Diabolin aus einer Kieselgelsäule (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.4.).

Diabolinpräparat: Acetonüberstand nach Proteinverdauung (Kap. 7.4.2.1.).

Kurve a: Kontrolle: fap-HSA

Kurve b: Chloroform-Eluat + fap-HSA

Kurve c: Aceton-Eluat + fap-HSA

Kurve d: Kontrolle: Diabolin + fap-HSA

Kurve e: Methanol-Eluat + fap-HSA

Die ganz überwiegende Menge an Diabolin wird in der Methanolfraktion wiedergefunden (Abb.18). Methanol ist das in dieser Reihe polarste Lösungsmittel. Nach Literaturangaben (Kates, 1972a) werden mit Methanol vorwiegend Phospholipide aus dem Kieselgel eluiert, während Fettsäuren, Steroide, Glyceride (Chloroformfraktion) und Glycolipide (Acetonfraktion) bereits vorher die Säule verlassen.

Weitere Verfeinerungen an diesem Trennsystem ergeben, daß in diesem speziellen Fall der Diabolin-Anreicherung auf die (kostenintensive) Chloroform-Elution ganz verzichtet werden kann (Daten nicht gezeigt). Darüberhinaus zeigt sich, daß das Lösungsmittelvolumen der Acetonfraktion ohne weiteres auf 20 % gesenkt werden kann (dünnschichtchromatografische Daten nicht gezeigt). Dies ist auch zu erwarten, da ja der überwiegende Teil der Serumlipide bereits durch die erste Acetonfällung des Serums abgetrennt wird.

Eine Subfraktionierung der Methanolelution zeigt, daß Diabolin die Kieselgelsäule bereits mit dem ersten Viertel des Lösungsmittelvolumens verläßt (Abb.19).

Eine weitere Eingrenzung des Elutionsvolumens ist mit erheblichen Einbußen an Hemmaktivität verbunden (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der Tatsache, daß Diabolin vom polarsten Lösungsmittel der angegebenen Reihe vom Kieselgel eluiert wird und sich nach Abziehen des Methanols bereitwillig in PBS löst, muß damit gerechnet werden, daß Diabolin mindestens eine polare Gruppierung im Molekül enthält

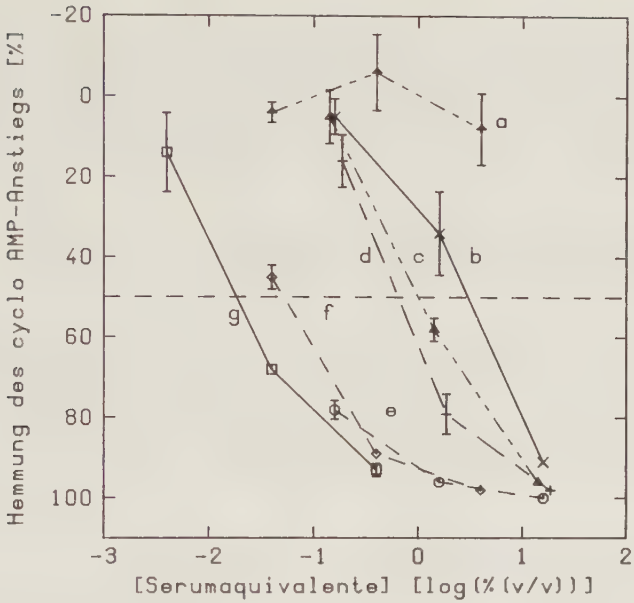


Abb. 19: Fraktionierte Elution der Kieselgelsäule mit Methanol (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.4.).

Diabolinpräparat: Acetonüberstand nach Proteinverdauung (Kap. 7.4.2.1.).

Kurve a: Kontrolle: fap-HSA

Kurve b: Subfraktion 76-100 %(v/v)* + fap-HSA

Kurve c: Subfraktion 48-75 %(v/v)* + fap-HSA

Kurve d: Subfraktion 26-47 %(v/v)* + fap-HSA

Kurve e: Subfraktion 1-25 %(v/v)* + fap-HSA

Kurve f: Gesamteluat + fap-HSA

Kurve g: Kontrolle: Acetonpulver in PBS (Seq)

* Das Gesamtelutionsvolumen (300 ml Methanol) entspricht 100 %.

und nicht oder nicht nur wegen seiner lipophilen Eigenschaften acetonlöslich ist. Das ist jedoch nur verträglich mit der Annahme, daß Diabolin diese beiden Eigenschaften in einem relativ kleinen Molekül vereinigt.

3.5.2. Extraktion von Acetonpulver

Die Methode der Wahl zur Gewinnung von proteinfreiem Diabolin ist die simple Extraktion des Faktors aus dem Proteinniederschlag einer Acetonfällung des Serums mit Hilfe eines geeigneten Lösungsmittels.

3.5.2.1. Trennung auf einer Kieselgelplatte

Um zu klären, ob es prinzipiell möglich ist, Diabolin durch ein Lösungsmittel(gemisch) von seinem Trägerprotein zu trennen und ob das gegebenenfalls mit vertretbaren Volumina an organischem Lösungsmittel zu realisieren ist, wurden entsprechende Versuche an Dünnschichtplatten durchgeführt. Unabdingbare Voraussetzung dafür ist jedoch, daß Diabolin nach einer entsprechenden Elution im Kieselgel nachweisbar ist.

Trägt man proteinfreies Diabolin in methanolischer Lösung auf eine Kieselgel-Dünnschichtplatte auf, trocknet den Auftragungsfleck im Stickstoffstrom und eluiert sofort wieder mit Methanol (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.6.), so wird lediglich ein Bruchteil an Diabolinaktivität zurückgewonnen (Abb.20).

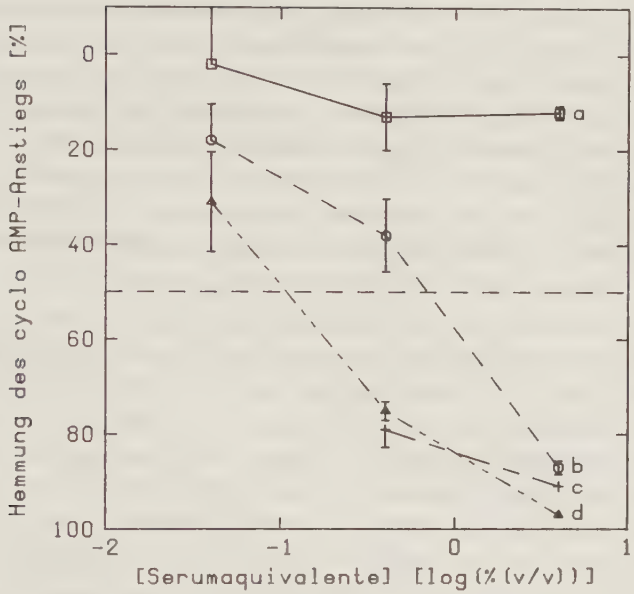


Abb. 20: Einfluß der Bindung von Diabolin an Protein auf seine Rückgewinnung von einer Kieselgelplatte (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.6.).

Diabolinpräparat: Methanoleluat der Kieselgelsäule (Kap. 3.5.1.2.), eingedampft und in Methanol aufgenommen.

Kurve a: Kontrolle: fap-HSA

Kurve b: Rückgewinnung des proteinfreien Diabolins

Kurve c: Rückgewinnung des proteingebundenen Diabolins

Kurve d: Kontrolle: Diabolin + fap-HSA

Dieser Befund widerspricht diametral den Ergebnissen, die bei der chromatografischen Reinigung von Diabolin an Kieselgelsäulen des gleichen Geltyps gefunden werden (Kap. 3.5.1.2.). Der einzige qualitative Unterschied zwischen beiden Verfahren besteht darin, daß im Falle der Verwendung von Dünnschichtplatten die Substanz auf dem Kieselgel vorübergehend eintrocknet. Wird Diabolin ohne Kieselgel in Glasgefäßen zur Trockne gebracht, was im Laufe der Anreicherung mehrfach geschieht, so sind dagegen keine gravierenden Ausbeuteverluste zu beklagen (Daten nicht gezeigt).

Das gleiche gilt für den Fall, daß Diabolin vor seiner Eintrocknung auf dem Kieselgel mit fap-HSA reaktiviert wird (Abb.20). Nimmt man an, daß die reaktiven Stellen des proteingebundenen Diabolins nicht unmittelbar mit dem Kieselgel in Kontakt kommen, wird auch durch den letztgenannten Befund die These gestützt, daß nur die Eintrocknung von Diabolin in unmittelbarem Kontakt zu Kieselgel zu den beobachteten Ausbeuteverlusten führt.

Entwickelt man proteinfreies Diabolin auf einer Dünnschichtplatte in einem Laufmittel aus Chloroform (40 Vt), Methanol (25 Vt), Aceton (3 Vt), Essigsäure (7 Vt) und Wasser (2 Vt), so wandert Diabolin vollständig in das Gel und kann nach Elution der gesamten Laufstrecke mit Methanol dort nachgewiesen werden (Abb.21, Kurve c).

Auch in diesem Fall kann die Aktivität jedoch, wie erwartet, nicht quantitativ zurückgewonnen werden.

Diabolin wird nach Reaktivierung mit fap-HSA auch aus proteingebundenem Zustand durch das angewandte Laufmittel in das Kieselgel eluiert.

Das aufgetragene Albumin verläßt dabei die Auftragsstelle nicht (Daten nicht gezeigt).

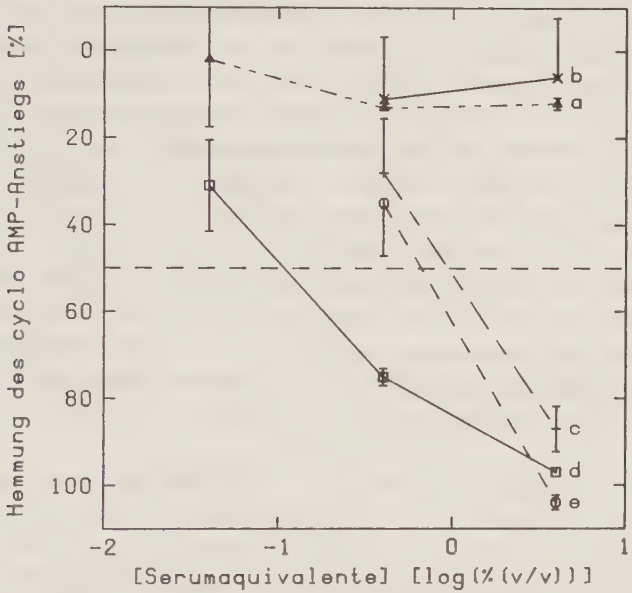


Abb. 21: Einfluß des Laufmittels bei einer TLC auf die Bindung von Diabolin an sein Trägerprotein.

Diabolinpräparat: reaktiviertes Methanoleluat der Kieselgelsäule (Kap. 3.5.1.2.) in PBS (2 Seq)

Kurve a: Kontrolle: fap-HSA

Kurve b: Methanoleluat des Auftragsflecks + fap-HSA

Kurve c: Methanoleluat der Laufstrecke + fap-HSA

Kurve d: Methanoleluat ohne Laufmittelkontakt* + fap-HSA

Kurve e: Kontrolle: Diabolin + fap-HSA

* Diabolin wurde auf die Dünnschichtplatte aufgetragen, ohne jedoch anschließend mit Laufmitteln in Berührung zu kommen.

3.5.2.2. Direkte Extraktion mit Lösungsmitteln

In der Literatur wird berichtet, daß Diabolin mit organischen Lösungsmitteln nicht extrahierbar sei (van Calker et al., 1977). Trotzdem galten die weiteren Bemühungen dem Versuch, die an dünnschichtchromatografischen Kieselgelplatten gewonnenen Ergebnisse (Kap. 3.5.2.1.) präparativ zu nutzen. Insbesondere mußte geklärt werden, ob das Laufmittelgemisch (Kap. 3.5.2.1.) in der Lage ist, Diabolin auch aus seiner nativen Proteinbindung zu lösen. Das ist der Fall (Daten nicht gezeigt) und kann auch ohne Kieselgel präparativ in einer Säule durchgeführt werden (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.14.). Methanol ist die im Laufmittelgemisch wirksame Komponente (Daten nicht gezeigt), wobei die Elutionseffektivität anderer primärer Alkohole mit fallender Polarität abnimmt (Abb.22).

Die Fließeigenschaften einer Säule werden zwar wesentlich verbessert, wenn man das Acetonpulver vor der Säulenfüllung trocken mit Kieselgel verreibt, aus einer solchen Säulenfüllung wird aber wiederum nur ein Bruchteil der theoretischen Aktivität eluiert (Daten nicht gezeigt).

3.5.2.3. Hydrophobe Chromatografie

Bei der Auftrennung des Methanolextraktes aus Acetonpulver im gleichen Laufmittel an einer hydrophoben Hydroxyisopropyl-Sephadex-Säule (LH 20) (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.12.) ergibt sich ein in allen Einzelheiten reproduzierbares Elutionsprofil (Abb.23).

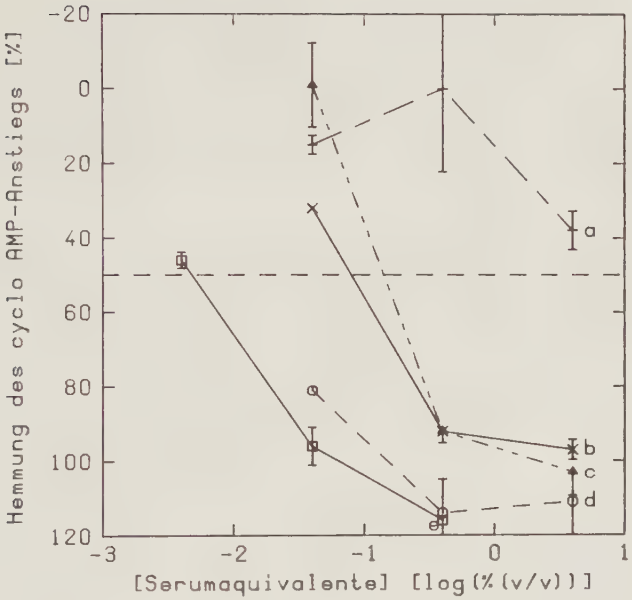


Abb. 22: Einfluß der Polarität des Lösungsmittels auf seine Fähigkeit, Diabolin aus Acetonpulver zu extrahieren (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.14.)

Kurve a: Kontrolle: fap-HSA

Kurve b: 1-Propanol-Extrakt + fap-HSA

Kurve c: Ethanol-Extrakt + fap-HSA

Kurve d: Methanol-Extrakt + fap-HSA

Kurve e: Kontrolle: Acetonpulver in PBS

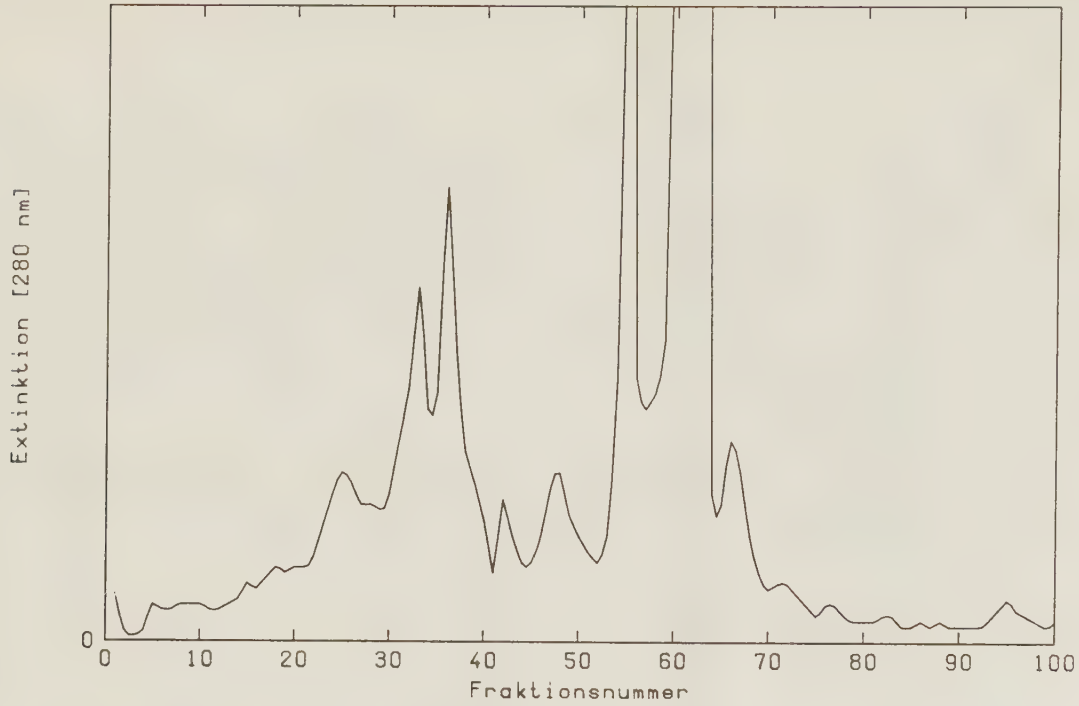


Abb. 23: Auftrennung des Methanolextraktes aus Acetonpulver durch hydrophobe Chromatografie (Sephadex LH 20) in Methanol (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.12.).

Die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm ist auf die Anwesenheit von Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin) und/oder entsprechender Peptide zurückzuführen, die durch das Extraktionsmittel aus dem Acetonpulver eluiert werden (Proteingehalt des Methanolextraktes: 0.13 - 0.21 mg/ml).

Im Gegensatz zu den identischen Elutionsdiagrammen in allen 7 Experimenten werden dagegen zwei Typen von Aktivitätsprofilen gefunden (Abb.24a und 24b). Gemeinsam ist beiden Diagrammen ein Aktivitätsgipfel unterschiedlicher Halbwertsbreite zwischen Fraktion 20 und 30, der auch die ganz überwiegende Menge an organischem Phosphat enthält (Tab.8).

Der eindeutige und reproduzierbare Unterschied in beiden Profiltypen besteht jedoch in der An- oder Abwesenheit eines breiten Aktivitätsbereichs zwischen Fraktion 40 und 50 (Abb.24b). Man könnte daraus schließen, daß die Hemmaktivität des Serums durch mehrere Faktoren unterschiedlichen Laufverhaltens hervorgerufen wird. Es ist aber auch denkbar, daß Diabolin selbst - möglicherweise abhängig von seiner Konzentration und/oder der anderer Moleküle - Assoziate unterschiedlicher Größe und Hydrophobizität bildet. Diese Annahme liegt nahe, insbesondere wenn man in Betracht zieht, daß aufgrund früherer Experimente (Kap. 3.5.1.2.) angenommen werden muß, daß das Molekül sowohl polare als auch unpolare Bereiche in sich vereinigt. Diese Annahme wird erhärtet durch den Befund, daß bei einer Rechromatografie des mittleren Aktivitätsgipfels (Abb.24b, Fraktionen 40 bis 50) unter identischen Bedingungen die Aktivität an der ursprünglichen Stelle verschwindet und in den Fraktionen 20 bis 28 erscheint, genau in dem Bereich, in welchem in beiden

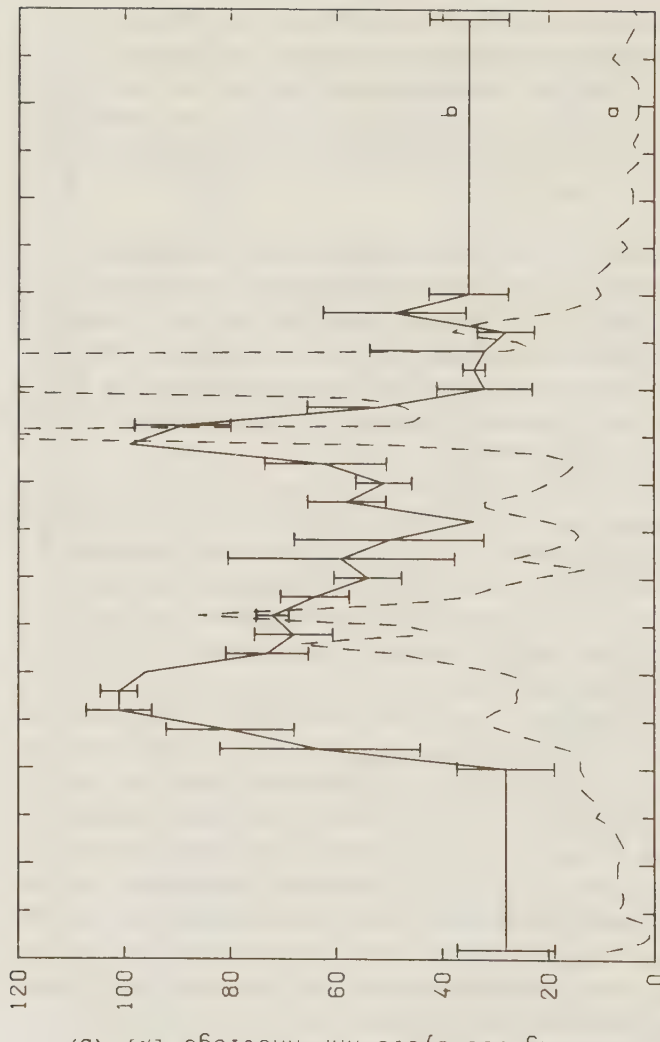


Abb. 24 a: Aktivitätsprofil nach Auftrennung des Methanolextraktes aus Acetonpulver durch hydrophobe Chromatografie (Sephadex LH-20) in Methanol (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.12.).

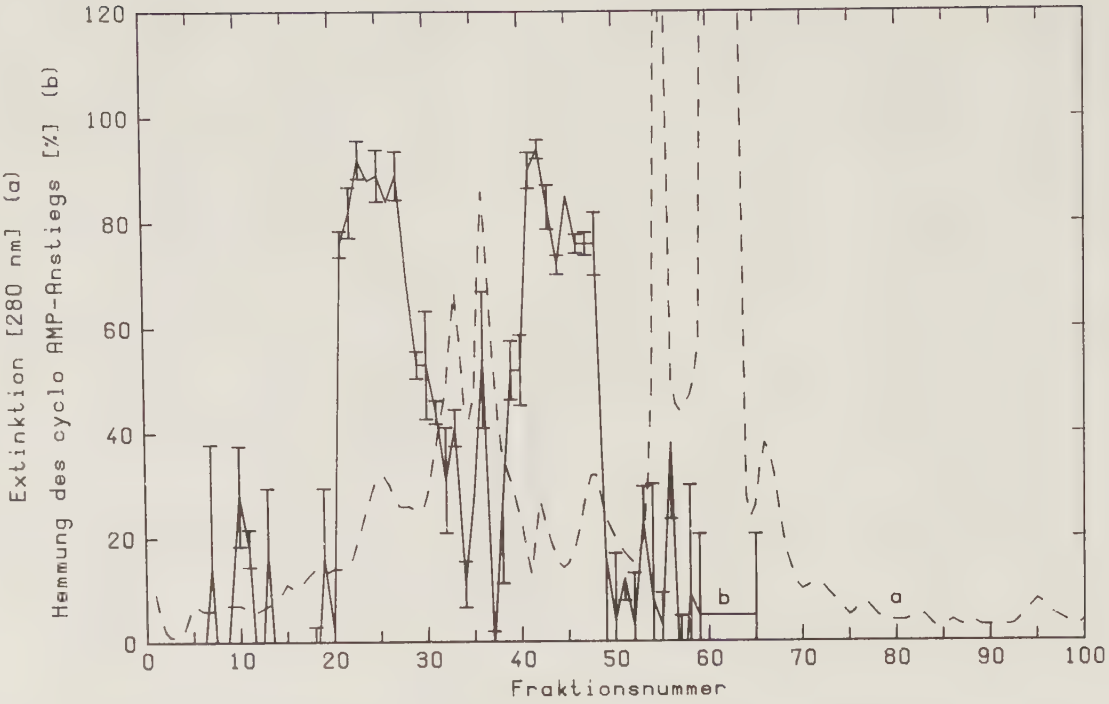


Abb. 24 b: Aktivitätsprofil nach Auftrennung des Methanolextraktes aus Acetonpulver durch hydrophobe Chromatografie (Sephadex LH-20) in Methanol (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.12.)

Profiltypen der gemeinsame erste Aktivitätsgipfel gefunden wird (Abb.25).

Der schmale Gipfel um Fraktion 55 (Abb.24a) wird nach einer entsprechenden Rechromatografie weder in dieser Fraktion, noch irgendwo anders im Chromatogramm gefunden (Daten nicht gezeigt), wohl bedingt durch die geringe Menge an Material.

Man muß daraus schließen, daß bei dieser Art von hydrophober Chromatografie lediglich der erste Aktivitätsgipfel Aussagekraft besitzt, während die beiden folgenden konzentrationsbedingte oder andere (allerdings reproduzierbare) Artefakte darstellen. Eine dritte Möglichkeit wäre, daß der erste Aktivitätsgipfel lediglich ein, wenn auch noch biologisch aktives, Umwandlungsprodukt des zweiten Gipfels enthält. Wäre dies der Fall, hätten künftige Isolierungsversuche erhebliche zusätzliche Schwierigkeiten zu überwinden.

Da immer wieder auch Aktivitätsbereiche mit sehr geringem Gehalt an organischem Phosphat gefunden werden (Tab.8, Fraktionen 41 bis 50), erscheint es zweifelhaft, ob der hohe Anteil an Phosphat im stabilen Aktivitätsgipfel (Tab.8, Fraktionen 23 bis 26) direkt etwas mit der Hemmaktivität zu tun hat. Das schließt freilich die Möglichkeit nicht aus, daß Diabolin trotzdem Phosphat enthält, da ja über die absolute Menge an Faktor bisher keine Angaben möglich sind. Auch eine cochromatografierte Verunreinigung, z.B. ein Phospholipid, käme als Ursprung des gemessenen Phosphats in Frage.

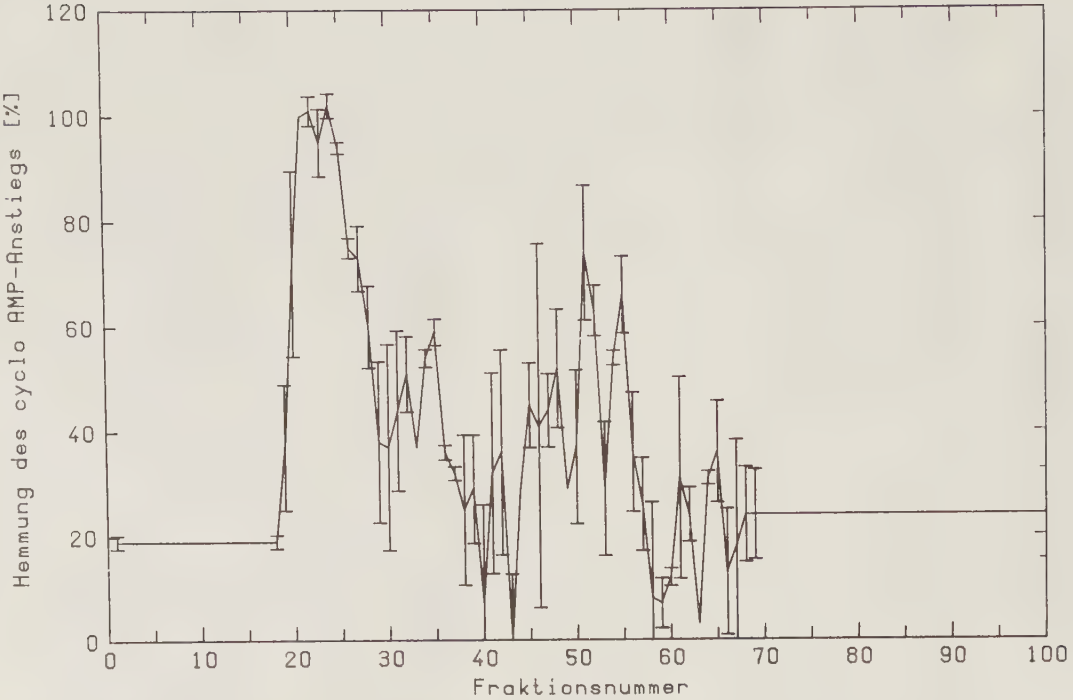


Abb. 25: Aktivitätsverlauf nach einer Rechromatografie der Fraktionen 40 bis 50 (Abb.24b) unter identischen Bedingungen.

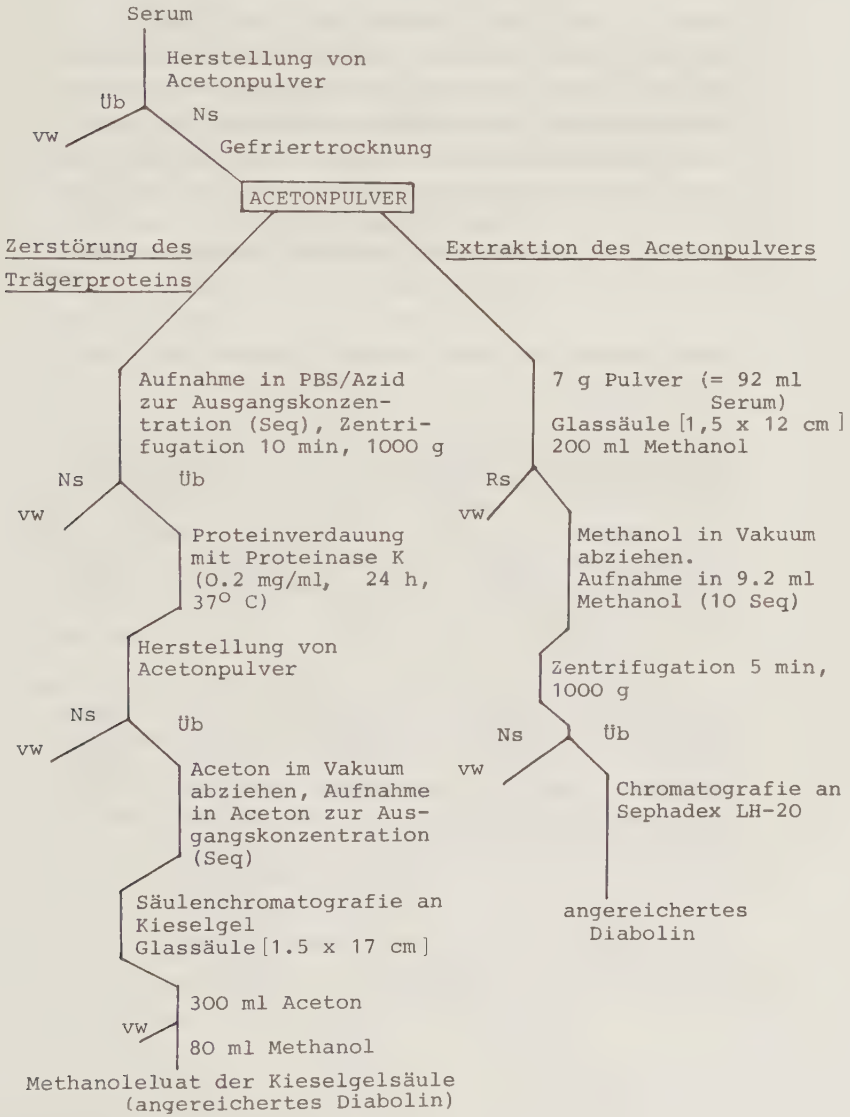
Tab. 8: Zucker- und Phosphatgehalt in den Fraktionen nach hydrophober Chromatografie von Diabolin (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.12., 7.4.3.5. und 7.4.3.6.)

Elutionsbereich Fraktion [6.6 ml]	Hemmaktivität	Phosphat [nmol/l]	Zucker [nmol/l]
1 - 22	-	20	340
23 - 26	+	2200	300
27 - 40	-	1200	5400
41 - 50	+	10	360
51 - 54	-	110	70
55	+	280	70
56 - 80	-	210	440

Der ganz überwiegende Teil an oxidierbarem Zucker wird immer in einem Elutionsbereich gefunden, der keine signifikante Diabolinaktivität aufweist (Tab.8, Fraktionen 27 bis 40). Es ist deshalb mit den oben gemachten Einschränkungen nicht wahrscheinlich, daß Diabolin Zucker enthält (siehe auch Kap. 3.8.1.2.3., 3.8.3. und 3.7.2.). Eine Molekulargewichtsbestimmung ist aufgrund des chromatografischen Verhaltens an hydrophober Matrix nicht möglich. Weiteren Aufschluß über Natur und Verhalten von Diabolin bei dieser Art von hydrophober Chromatografie werden detaillierte Untersuchungen mit anderen Laufmitteln und -gemischen erbringen.

Abb. 26: Schematischer Überblick über zwei Anreicherungsmethoden für Diabolin.

vw = verworfen, Üb = Überstand, Ns = Niederschlag, Rs = Rückstand



3.5.3. Zusammenfassung

1. Diabolin ist durch Protease nicht zerstörbar.

2. Die biologische Hemmaktivität von Diabolin ist an die Anwesenheit von Protein gebunden.

3. Auch Proteinase K kann als Trägerprotein fungieren.

4. Diabolin bleibt nach vollständiger Verdauung aller Proteine im Überstand einer Acetonfällung.

5. Proteinfreies Diabolin kann mit Methanol aus einer Kieselgelsäule eluiert werden.

6. Diabolin kann mit Methanol aus dem Acetonpulver des Serums extrahiert werden.

7. Eintrocknung von proteinfreiem Diabolin in Gegenwart von Kieselgel führt zu erheblichen Ausbeuteverlusten bei der anschließenden Elution.

8. Das Laufverhalten der Diabolinaktivität bei der hydrophoben Chromatografie an Sephadex LH 20 in Methanol ist nicht einheitlich. Es bilden sich dabei reproduzierbar Assoziate, die zumindest teilweise ineinander überführbar sind.

3.6. Untaugliche Anreicherungsmethoden und ihre Bedeutung für die Charakterisierung

Der ganz überwiegende Teil der vergeblichen Versuche, Diabolin mit klassischen Methoden anzureichern, entspringt der Annahme, es handle sich bei Diabolin um ein Protein. Diese Annahme war aufgrund seines Verhaltens, z.B. bei der Gleichgewichtsdialyse, gegenüber Ammoniumsulfat und Proteasen gerechtfertigt.

3.6.1. Fällung

Obwohl Diabolin durch Ammoniumsulfat (85 % relativer Sättigung) vollständig fällbar ist, gelingt es nicht, eine entsprechende Fraktionierung durchzuführen. Die meiste Aktivität wird zwar im Bereich zwischen 37 % und 50 % relativer Sättigung gefunden, einem Fraktionierungsbereich, in dem aber auch die größte Menge an Serumproteinen in den Niederschlag fällt (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung ist rückblickend, wie viele andere auch, dadurch zu erklären, daß Diabolin unspezifisch, aber sehr fest, an Proteine bindet (Kap. 3.2.2.).

Aus dem gleichen Grund ist im nachhinein auch nicht zu erwarten, daß Diabolin in einer der Fraktionen einer kombinierten pH/Ethanol-Fraktionierung nach Cohn (Cohn et al., 1946) (Methode 6) lokalisierbar ist. Dasselbe gilt für den sequentiellen Zusatz von Hydroxylapatit oder Sulfosalicylsäure. Die Experimente bestätigen die Erwartungen (Daten nicht gezeigt).

3.6.2. Extraktion

Versucht man, Diabolin direkt aus dem Acetonpulver mit Hilfe organischer Lösungsmittel im "batch"-Verfahren zu extrahieren, so werden maximal zwanzig Prozent der Aktivität im organischen Überstand gefunden (Tab.9). Andererseits ist die Hemmwirkung des Proteinrückstandes nach der Extraktion im biologischen Test nicht von der Kontrolle zu unterscheiden (Daten nicht gezeigt).

Tab. 9: Aus Acetonpulver mit organischen Lösungsmittel(gemischen) im "batch"-Verfahren extrahierbare Hemmaktivität. Das Lösungsmittelvolumen entspricht dem Volumen des Ausgangsserums (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.13.)

Lösungsmittel(gemisch) [Volumenteile]		Hemmaktivität [%]
-		= 100
$CHCl_3$		3.4
MeOH		4.6
$MeOH/CHCl_3$	1 + 2	17
$MeOH/CHCl_3$	2 + 1	0.9
$EtOH/Et_2O$	3 + 1	15
Diisobutylketon		0.7

Weder Erhöhung der Ionenstärke und/oder Protonenaktivität (0.1 mol/l Glycin-HCI, pH 2.0), noch Erhitzen am Rückfluß (20 min), führt zu einer Steigerung der Hemmausbeute im Extraktionsüberstand (Daten nicht gezeigt).

Dieser Befund steht in scheinbarem Widerspruch zur früher beschriebenen (Kap. 3.5.2.2.), erfolgreichen Anreicherungsmethode durch Methanol-Extraktion des Acetonpulvers. Der Unterschied in beiden Protokollen besteht lediglich in der Verwendung einer Säule im Falle der Anreicherung, während sämtliche oben erwähnten Extraktionen mit organischen Lösungsmitteln im "batch"-Verfahren durchgeführt werden (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.13.). Man muß daraus schließen, daß sich Diabolin nur dann mit Hilfe von Methanol von seinem Trägerprotein trennen läßt, wenn permanent das Dissoziations-/Assoziations-Gleichgewicht, z.B. in einer Chromatografie, gestört wird. Diese Annahme wird im folgenden noch erhärtet werden.

3.6.3. Chromatografie

3.6.3.1. Ionenaustausch als Trennprinzip

3.6.3.1.1. DEAE-Cellulose

Eine der effektivsten Trennmethoden für biologisches Material steht in der Ionenaustauschchromatografie an

DEAE-Cellulose zur Verfügung. Um festzustellen, ob eine Chance besteht, Diabolin mit dieser Methode anzureichern, wird Acetonpulver aus Serum, gelöst in 50 mmol/l NH_4OAc-Puffer (pH 6.5) mit DEAE-Cellulose im "batch"-Verfahren inkubiert (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.1.). Nur 6 Prozent der Anfangsaktivität verbleiben nach dem Einrühren im Überstand (Daten nicht gezeigt). Andererseits kann mit einem zehnfach konzentrierten Puffer ansonsten gleicher Zusammensetzung sämtliche Hemmaktivität von der Cellulose eluiert werden (Abb.27).

Die naheliegende Vermutung, daß Diabolin unter diesen Bedingungen an DEAE-Cellulose zu reinigen ist, erwies sich als irrig.

Versucht man nämlich, das im "batch"-Verfahren (Abb.27) eluierte Material an der identischen DEAE-Cellulose in einer Säule unter gleichen Randbedingungen aufzutrennen (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.3.), so werden nur unbedeutende Mengen an Hemmaktivität zurückgewonnen (Tab.10).

Weder die Totalrekombination aller Einzelfraktionen (Tab.10), noch eine weitere Erhöhung der Ionenstärke (1 mol/l NaCl) im Elutionspuffer, noch die Regeneration der Cellulose mit Salzsäure (0.5 mol/l) führt zur Rückgewinnung nennenswerter Hemmaktivitäten (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund ist unabhängig vom Werkstoff der Säulenwand (Glas, Plexiglas).

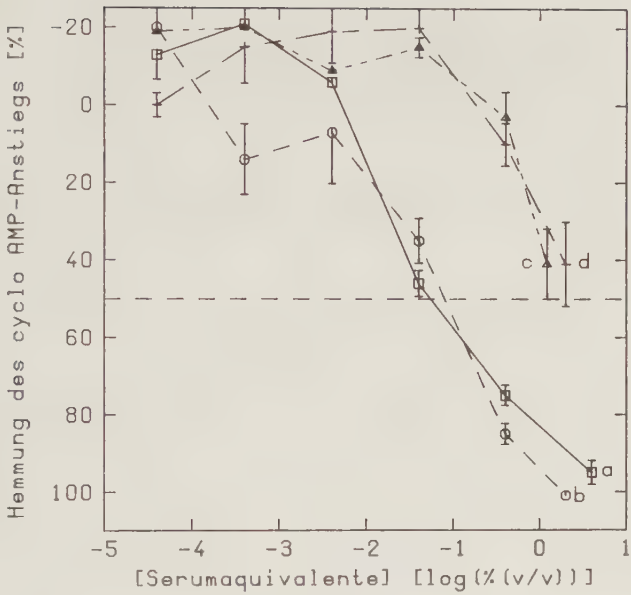


Abb. 27: Adsorption und Desorption proteingebundenen Diabolins an bzw. von DEAE-Cellulose im "batch"-Verfahren (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.1.).

Diabolinpräparat: Acetonpulver in 50 mmol/l NH_4OAc-Puffer (pH 6.5, Seq)

Kurve a*: Kontrolle: Diabolin

Kurve b: Niedersalz-Eluat [0.5 mol/l NH_4OAc--Puffer (pH 6.5)]

Kurve c: Hochsalz-Eluat [0.5 mol/l NH_4OAc--Puffer (pH 6.5), 1 mol/l NaCl]

Kurve d: Regenerat [0.5 mol/l HCl]

* Die auf Hemmaktivität getesteten Fraktionen fallen innerhalb eines Experimentes entsprechend der alphabetischen Kurvenbezeichnung sequentiell auf.

Tab. 10: Hemmaktivität der Eluate nach einer Chromatografie von Acetonpulver an DEAE-Cellulose (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.3.)

Elutionsbereich Fraktionen [9.8 ml]	Diabolinaktivität [bu/ml]	[%]	Proteingehalt [mg/ml]	[%]
Kontrolle (Auftrag)	4860	= 100	77.5	= 100
1 - 12	-	-	0	0.1
13 - 20	24	0.5	25	32
21 - 27	-	-	4.1	5.2
28 - 37	-	-	1.3	1.6
38 - 75	6	0.1	1.7	2.2
76 - 92	15	0.3	5.2	6.6
93 - 112	236	4.9	22	28
113 - 130	33	0.7	14	17
131 - 144	75	1.5	4.0	5.1
Totalrekombinat	870	10	69	89

Es wäre denkbar, daß durch die Chromatografie ein für die Aktivität essentielles Ion ausgewaschen wird. Auch der Zusatz einer Ionenmischung (6 mmol/l $ZnCl_2$, 0.6 mmol/l $CuSO_4$, je 0.7 mmol/l $CoCl_2$ und Na_3MoO_4, 30 µmol/l Na_2SeO_3 und 130 µmol/l $MnCl_2$) zum Totalrekombinat hat keinen Effekt auf die erzielbare Hemmung (Daten nicht gezeigt). Man muß daraus schließen, daß Diabolin

die Cellulose-Säule nicht verläßt, während es unter den gleichen Bedingungen im "batch"-Verfahren quantitativ von der identischen DEAE-Cellulose eluiert werden kann. Eine Ursache für dieses Verhalten könnte sein, daß im Falle der Elution von der Säule andauernd ein Bindungsgleichgewicht gestört wird (siehe auch 3.5.2.2.). Diese Annahme setzt jedoch voraus, daß Diabolin sowohl von DEAE-Cellulose als auch von Protein gebunden werden kann.

Um diese Frage zu klären, wird proteinfreies Diabolin (in 25 mmol/l Tris-Puffer, pH 6.8, 4 ^{o}C) mit DEAE--Cellulose im "batch"-Verfahren inkubiert (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.2.). Diabolin bindet dabei quantitativ (auch bei pH 2.0, Daten nicht gezeigt) an die DEAE-Cellulose (Abb.28) und kann aus dieser Bindung durch die allübliche Erhöhung von Ionenstärke (0.5 mol/l NaCl) und/oder Protonenkonzentration (pH 2.0) im Elutionspuffer nicht gelöst werden (Daten nicht gezeigt).

Fap-HSA ist in wässeriger 1 %iger (w/v) Lösung in der Lage, an DEAE-Cellulose gebundenes Diabolin zumindest teilweise zu desorbieren (Abb.28, Kurve c). Alle diese Beobachtungen sind unter sich und mit der Annahme verträglich, daß Diabolin sowohl von Serumalbumin als auch von DEAE-Cellulose sehr fest gebunden werden kann.

3.6.3.1.2. Andere Cellulosen

Der Befund der quantitativen Bindung von proteinfreiem Diabolin an DEAE-Cellulose gilt ohne Einschränkung auch für CM- und Phospho-Cellulose (Daten nicht gezeigt).

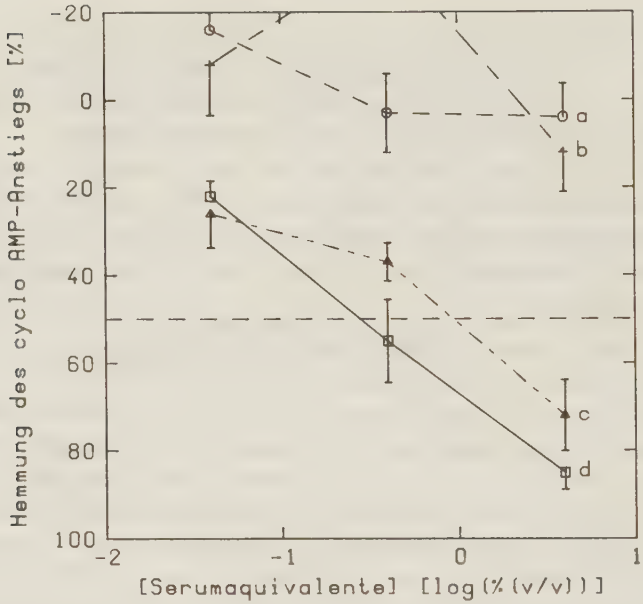


Abb. 28: Einfluß des Trägerproteins auf die Bindung von Diabolin an DEAE-Cellulosegel und dessen Eluierbarkeit ("batch"-Verfahren; experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.2.).

Diabolinpräparat: Methanoleluat der Kieselgelsäule (Kap. 3.5.1.2.) in 25 mmol/l Tris-HCl-Puffer (pH 7.4, 4 °C, Seq)

Kurve a: Kontrolle: fap-HSA

Kurve b: Gelüberstand nach Inkubation mit proteinfreiem Diabolin

Kurve c: Eluat erzeugt mit 1 %(w/v) fap-HSA in Tris-HCl-Puffer (s.o.)

Kurve d: Kontrolle: Diabolin + fap-HSA

Eine Ablösung des Diabolins vom Säulenmaterial ist auch im Falle der CM-Cellulose mit konventionellen Methoden nicht möglich (Daten nicht gezeigt; Phospho--Cellulose im "batch"-Verfahren nicht getestet).

Analog zur DEAE-Cellulose ist auch bei der Säulenchromatografie von proteingebundenem Diabolin an beiden Kationenaustauschern keine Hemmaktivität eluierbar (jeweils nur ein Experiment, Daten nicht gezeigt).

Aus diesen Befunden muß man wiederum schließen, daß Diabolin unspezifisch an Cellulosen bindet, unabhängig vom Ionenbesatz des Kohlenhydratgerüstes.

Um das zu überprüfen, werden die entsprechenden Experimente mit ladungsfreier Cellulose wiederholt.

Wie vermutet (befürchtet), bindet Diabolin unspezifisch auch an underivatisierte Cellulose, jedoch nicht vollständig (Abb.29). Die Hemmaktivität ist von dort weder mit erhöhter Ionenstärke, noch mit Methanol im "batch"--Verfahren zu eluieren (Daten nicht gezeigt). Man kann daraus schließen, daß die chemisch in die Cellulose eingeführten geladenen Gruppen ungeachtet ihres Vorzeichens die Kapazität der Cellulose und/oder ihre Affinität zu Diabolin zusätzlich erhöhen. Dies ist aber nur möglich, wenn Diabolin zwei gegensätzlich geladene Gruppen trägt. In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß Cellulose ein lineares Kohlenhydratgerüst darstellt, während Albumin zu den wenigen bekannten größeren Proteinen zählt, die keinerlei Kohlenhydratanteil aufweisen (Brown, 1977). Man muß deshalb davon ausgehen, daß sich die Bindung von Diabolin an Albumin und Cellulose qualitativ unterscheidet.

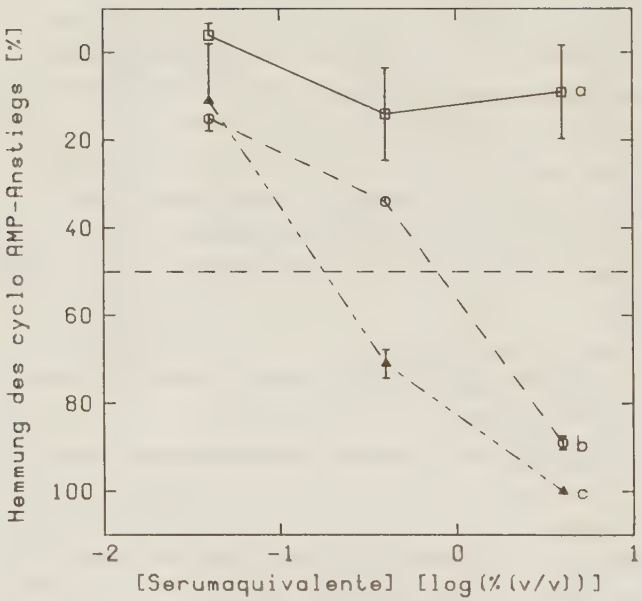


Abb. 29: Einfluß des Kontaktes eines proteinfreien Diabolinpräparates mit Cellulosegel auf die Hemmaktivität des Präparates (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.2.).

Diabolinpräparat: Methanoleluat einer Kieselgelsäule (Kap. 3.5.1.2.), aufgenommen in 25 mmol/l Tris-HCl-Puffer (pH 7.4, 4 °C, Seq)

Kurve a: Kontrolle: fap-HSA

Kurve b: im Gelüberstand verbleibende Restaktivität + fap-HSA

Kurve c: Kontrolle: Diabolin + fap-HSA

Diese spezielle Eigenschaft von Diabolin, bei Chromatografie an ionischer Cellulose (Himmelhoch & Peterson, 1966) zu verschwinden, zeichnet auch andere Faktoren aus (Humbel, 1978; Benveniste, 1974).

3.6.3.1.3. Andere Ionenaustauscher

Um zu klären, ob der oben beschriebene Adsorptionseffekt für Cellulose spezifisch ist oder ob auch andere Kohlenhydratpolymere Diabolin zu binden vermögen, wird proteinfreies Diabolin im "batch"-Verfahren mit DEAE-Sepharose bzw. DEAE-Sephacel unter gleichen Bedingungen inkubiert (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.2.). Beide Chromatografiematerialien binden proteinfreies Diabolin ebenfalls quantitativ (Daten nicht gezeigt).

Hydroxylapatit ist ein oft sehr effizienter Ionenaustauscher. Auch aus einer damit gefüllten Säule kann mit konventioneller Phosphatelution (Bernardi, 1973) nur ein Bruchteil der Hemmaktivität des aufgetragenen Acetonpulvers (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.9. eluiert werden (Daten nicht gezeigt).

3.6.3.1.4. Zusammenfassung

1. Proteingebundenes Diabolin wird an DEAE-Cellulose im "batch"-Verfahren gebunden und kann durch Erhöhung der Ionenstärke quantitativ zurückgewonnen werden.

2. Bei der Säulenchromatografie an DEAE-Cellulose kann proteingebundenes Diabolin nicht eluiert werden. Dasselbe gilt für CM- und Phospho-Cellulose wie für Hydroxylapatit.

3. Proteinfreies Diabolin bindet unspezifisch an Cellulosen, unabhängig von Anwesenheit und Art der Ladung auf dem Kohlenhydratgerüst, außerdem an DEAE-Sepharose und -Sephacel. Im Falle der Cellulosen ist ein synergistischer Effekt der Ladungen des Gels auf die Bindungskapazität und/oder -affinität zu beobachten.

4. Proteinfrei gebundenes Diabolin ist vom Kohlenhydratgerüst manch gängiger Chromatografiematerialien mit konventionellen Methoden nicht zu eluieren, jedoch kann im "batch"-Verfahren ein Teil der Diabolinaktivität durch fap-HSA aus der Bindung an DEAE--Cellulose gelöst werden.

3.6.3.2. Molekülgröße als Trennprinzip

Eine Molekularsiebchromatografie der Serumaktivität könnte Aufschluß über die Größe des Trägerproteins für Diabolin erbringen. Eine Chromatografie von gelöstem Acetonpulver an Sephadex G-100-Superfine (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.7.) führt zwar zu einer Auftrennung der Diabolinaktivität in drei Gipfel, aber diese sind mit denen des Proteins (Extinktion bei 280 nm) kongruent (Abb.30).

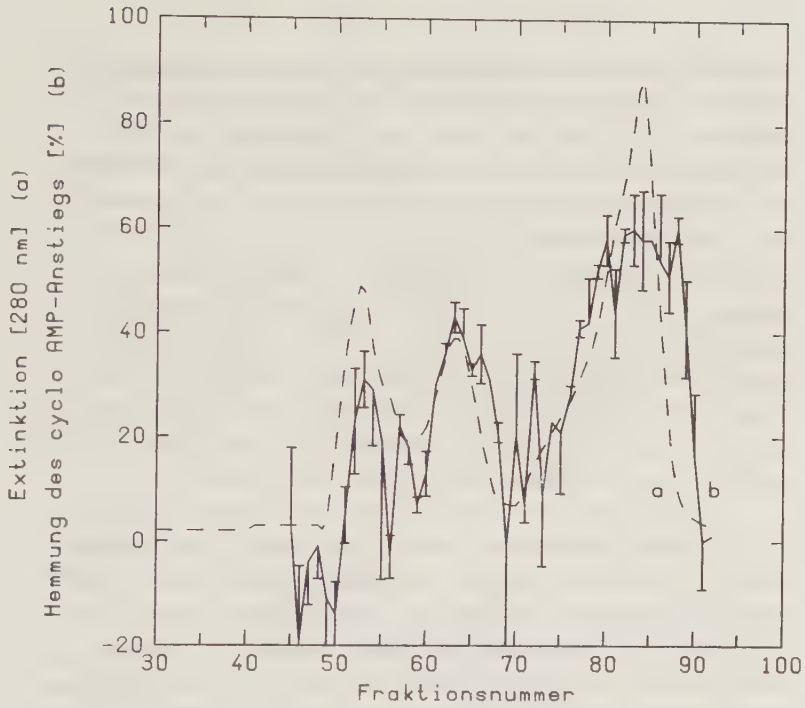


Abb. 30: Aktivitäts- und Extinktionsprofil nach einer Molekularsiebchromatografie von in PBS gelöstem (Seq) Acetonpulver an Sephadex G-100--Superfine (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.7.).

In keiner der Fraktionen 93 bis 209 wird eine Hemmaktivität über 15 % der Grundstimulation gemessen (Daten nicht gezeigt), obwohl das Extinktionsprofil im Bereich von Fraktion 209 einen weiteren kleinen Gipfel aufweist.

Sephadex, ein nicht präparativ mit geladenen Gruppen beladenes Kohlenhydratpolymer, scheint eine weitaus geringere Affinität zu Diabolin zu besitzen als DEAE--Cellulose (Kap. 3.6.3.1.). Eine Trennung der Aktivität von seinem Trägerprotein hat unter diesen Bedingungen nicht stattgefunden.

Unterwirft man das Acetonpulver vor der chromatografischen Auftrennung einer proteolytischen Spaltung (2 mg/ml Pronase, PBS, 45 min, 37 °C), so wird keine qualitative Änderung hinsichtlich des Laufverhaltens von Diabolin beobachtet. Die Hemmaktivität läuft kongruent mit den nun allerdings zahlenmäßig wie quantitativ veränderten Peptidgipfeln (Daten nicht gezeigt).

Es erscheint sinnvoll zu klären, ob Diabolin möglicherweise in Gegenwart von SDS chromatografisch von seinen Trägerproteinen zu trennen ist. Wird Acetonpulver 5 min lang bei 75 °C mit SDS [Endkonzentration 0.1 %(w/v)] denaturiert und anschließend in Gegenwart von 0.033 % (w/v) wässerigem SDS an Sephacryl S-200 chromatografiert, so wird nur noch ein einziger "Aktivitätsgipfel" gefunden (Daten nicht gezeigt). Dieser Gipfel ist jedoch nicht mit einem Proteingipfel zu korrellieren und tritt auch in einem Kontrollauf ohne Acetonpulver auf. Er wird als mögliches Artefakt einer SDS-Micellenbildung interpretiert. Entweder läuft das von seinem Protein getrennte Diabolin zufällig oder aus anderen Gründen mit dem SDS-Micellengipfel oder aber Sephacryl S-200 gehört zu den Chromatografiematerialien, an die Diabolin unspezifisch bindet. Eine Entscheidung kann auf der Basis der vorliegenden Experimente nicht getroffen werden.

3.6.3.3. Affinität als Trennprinzip

Concanavalin A besitzt eine besonders hohe Affinität zu Mannosyl- und Glucosylresten. Proteingebundenes Diabolin wird von einer Säule aus Concanavalin A-gekoppelter Sepharose Cl-4B nicht zurückgehalten (Daten nicht gezeigt, experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.8.). Entweder trägt Diabolin keinen geeigneten Zuckerrest (Albumin weist selbst keine Kohlenhydrate auf) oder aber das Lektin erkennt dieses Strukturelement infolge der Bindung an Protein nicht.

Der gleiche Befund wird auch an einer Säule aus Blue-Sepharose erhoben. Der hierbei als Trennprinzip verwandte Farbstoff erkennt insbesondere Nucleotid-Bindungsstellen an Proteinen (Daten nicht gezeigt).

Der in Affi-Gel-Blue an das Chromatografiematerial gekoppelte Farbstoff Cibacron Blue F-3-GA hat eine besonders hohe Affinität zu Serumalbumin (Travis et al., 1976). Für die Trennung in einer solchen Säule bietet sich der Albumingipfel aus der Molekularsiebchromatografie (Abb.30) an. Der dritte Proteingipfel aus dieser Trennung [Fraktionen 70 bis 90] (Kap. 7.4.1.7.) enthält zwischen 60 und 70 % der Hemmaktivität (Daten nicht gezeigt) und neben dem Hauptbestandteil Albumin noch eine Reihe weiterer Proteine vergleichbarer Größenordnung. Bei dem Versuch, die in diesem Gipfel enthaltene Aktivität über eine Affi-Gel-Blue-Säule vom Serumalbumin abzutrennen (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.10.), geht der größte Teil der Hemmaktivität verloren (Tab.11).

Tab. 11: Verteilung der Hemmaktivität nach Trennung des "Serumalbumin-Gipfels" einer Molekularsiebchromatografie an Affi-Gel-Blue (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.7. und 7.4.1.10.).

Fraktion	Diabolinkonz.		Proteingehalt	
	[bu/ml]	[%]	[mg/ml]	[%]
Kontrolle: Material vor Auftrag auf die Säule	12300	= 100	24.3	= 100
Durchfluß	1780	14.5	6.5	26.7
Eluat	1110	9.0	13.5	55.6
Regenerat	1000	8.2	5.8	23.9
Rekombinat	7510	61.1	27.9	115
Durchfluß + fap-HSA (6 %(v/v))	9080	73.8	n.b.	

Durch eine Rekombination aller drei Säulenfraktionen können jedoch über 60 Prozent der ursprünglichen Aktivität zurückgewonnen werden (Tab.11). Daraus muß man schließen (historisch der erste Hinweis), daß für die maximale Hemmwirkung von Diabolin mindestens zwei Komponenten erforderlich sind, die an Affi-Gel-Blue getrennt werden.

Zusatz von Serumalbumin zum Säulendurchfluß führt ebenfalls zu einer wesentlichen Verstärkung des Hemmeffekts (Tab.11). Man kann deshalb annehmen, daß nur eine weitere Komponente zur vollen Entfaltung der Hemmaktivität von

Diabolin erforderlich ist und diese Komponente entweder Serumalbumin selbst ist oder von Serumalbumin zumindest effizient ersetzt werden kann.

3.6.3.4. Adsorption als Trennprinzip

Die dünnschichtchromatografische Auftrennung eines proteinfreien Diabolinpräparates (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.5.) auf einer Kieselgelplatte in einem relativ hydrophilen Laufmittel [Chloroform (40 Vt), Methanol (25 Vt), Aceton (3 Vt), Essigsäure (7 Vt) und Wasser (2 Vt)] ergibt vier deutlich voneinander getrennte Flecken, unabhängig von der Art der Anfärbung (Iod-Dampf bzw. Rhodamin 6B-Aerosol) (Abb. 31).

Die biologische Hemmaktivität wird dabei jeweils in einem Bereich eluiert (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.6.), der weder mit einem der sichtbaren Flecken korrelliert werden kann, noch in Relation zu diesen ein reproduzierbares Adsorptionsverhalten aufweist (Daten nicht gezeigt). Diesem Verhalten von Diabolin, seinem Namen gerecht, könnten dieselben Ursachen zugrunde liegen wie den Befunden, die bei der Chromatografie des Faktors an einer hydrophoben Sephadex-Säule (Kap. 3.5.2.3.) erhoben werden. Dort konnte gezeigt werden, daß die Hemmaktivität in verschiedenen, allerdings definierten, Gipfeln auftritt, von denen einer in einen anderen überführbar ist.

Es wäre auch denkbar, daß Diabolin in unterschiedlichem Ausmaß noch an Peptidbruchstücke gebunden ist (Fukushima et al., 1981). Um genaueren Einblick in dieses unerwartete Verhalten von Diabolin zu gewinnen, müssen

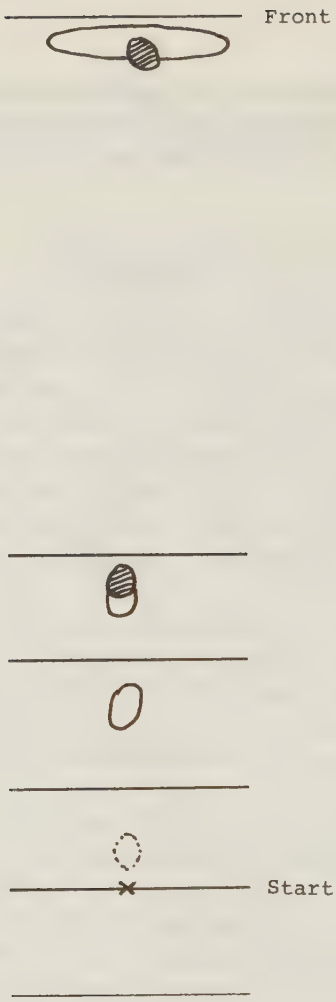


Abb. 31: Fleckenmuster einer dünnschichtchromatografischen Auftrennung des Methanoleluates einer Kieselgelsäule (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.5.).

Die schraffierten Flächen sind bereits bei 254 mm-Anregung sichtbar, alle anderen Flecken nach Anfärbung mit Rhodamin 6G.

Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Hemmfaktor durchgeführt werden. Das bisher einzig verfügbare biologische Testsystem ist zu einer Aufklärung dieser Befunde nicht in der Lage, zumal die Ausbeute bei der Rückgewinnung der Hemmaktivität von der Kieselgelplatte 30 % selten übersteigt (Kap. 3.5.2.1.).

3.6.4. Zusammenfassung

1. Natives, proteingebundenes Diabolin zeigt bei klassischen Proteinanreicherungsmethoden die Eigenschaften der jeweiligen Trägerproteine.

2. Proteinfreies Diabolin bindet unspezifisch an Cellulose, insbesondere an durch ionische Gruppen derivatisierte, und kann lediglich mit fap-HSA von dort partiell desorbiert werden.

3.7. Chemische und physikalische Charakterisierung

3.7.1. Temperaturstabilität

Sämtliche Seren, die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt werden, sind vor ihrer Verwendung zur Inaktivierung des Komplementsystems 30 min lang bei einer Temperatur von 56 °C gehalten worden.

Die Hemmaktivität von Serum wird durch 15 min Kochbehandlung nicht beeinträchtigt (van Calker, 1977), auch nicht bei tausendfach höherer Protonenkonzentration (Daten nicht gezeigt). Dies gilt jedoch nur dann, wenn dabei gleichzeitig Vorsorge getroffen wird, z.B. durch zehnfache Verdünnung, daß bei dieser Behandlung kein Protein ausfällt. Mit dieser Maßgabe sind auch alle früheren Daten zum Verhalten von Diabolin bei Sterilisation (121 °C) des Serums in verschiedenen Verdünnungen und in Gegenwart verschiedener Salzkonzentrationen (Wagner, 1978) in Einklang zu bringen.

Proteinfreies Diabolin dagegen kann unverdünnt und bei physiologischer Salzkonzentration (330 mosmol/l) mindestens 30 min lang bei neutralem pH gekocht werden, ohne daß seine biologische Hemmaktivität, nach Reaktivierung mit fap-HSA, Schaden leidet (Abb.32).

Dieser Befund erzwingt den Schluß, daß Diabolin keine für den biologischen Hemmeffekt notwendige und bei neutralem pH-Wert hydrolyselabile Bindung aufweist.

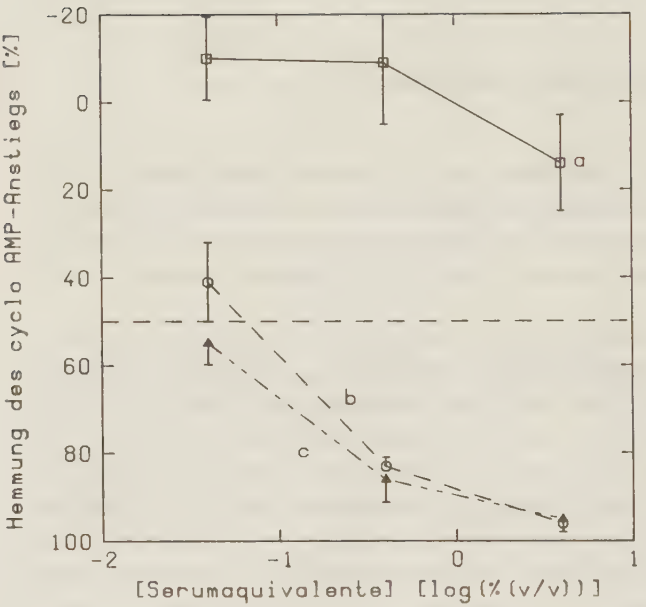


Abb. 32: Einfluß von 30 min Kochen bei neutralem pH-Wert auf die Hemmaktivität von proteinfreiem Diabolin.

Diabolinpräparat: Methanoleluat der Kieselgelsäule (Kap. 3.5.1.2.) in PBS

Kurve a: Kontrolle fap-HSA

Kurve b: Diabolin nach Behandlung + fap-HSA

Kurve c: Kontrolle: Diabolin + fap-HSA

3.7.2. Säurestabilität

Proteingebundenes Diabolin ist gegen Säure (HCl, pH 1.0, 1 h, 20 °C) resistent (van Calker, 1977). Wird proteinfreies Diabolin dagegen im stark Sauren (pH -0.3) 4 h lang bei 100 °C am Rückfluß erhitzt, so wird auch nach Reaktivierung mit fap-HSA keinerlei Hemmaktivität mehr gefunden (Abb.33). Unter diesen Bedingungen werden im allgemeinen neben glykosidischen Bindungen auch Phosphatester gespalten.

Unter Bedingungen,unter denen Proteine vollständig hydrolysiert werden (6 mol/l HCl, 120 °C, 22 h) wird die Diabolinaktivität ebenfalls quantitativ zerstört (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund ist u.a. deshalb von Bedeutung, weil er beweist, daß Diabolin über mindestens eine im Sauren spaltbare Bindung verfügt. Es kann sich bei Diabolin deshalb auch weder um ein einfaches Ion, z.B. Vanadat (Cantley, 1977), noch um eine einfache Fettsäure handeln.

3.7.3. Adsorption an Aktivkohle

An sein Trägerprotein gebundenes Diabolin adsorbiert an Holzkohle (van Calker, 1977). Diese Adsorption ist jedoch abhängig von der Inkubationstemperatur des Ansatzes (Abb.34).

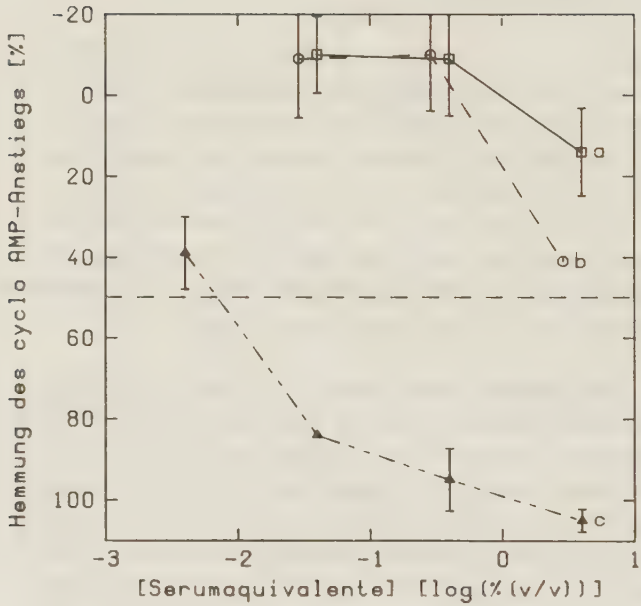


Abb. 33: Einfluß von heißer Säure auf die Hemmaktivität von Diabolin (2 mol/l HCl, 4 h lang bei 96 °C unter Rückfluß).

Diabolinpräparat: Methanoleluat der Kieselgelsäule (Kap. 3.5.1.2.) in PBS

Kurve a: Kontrolle: fap-HSA

Kurve b: Diabolin nach Säureexposition + fap-HSA

Kurve c: Kontrolle: Diabolin + fap-HSA

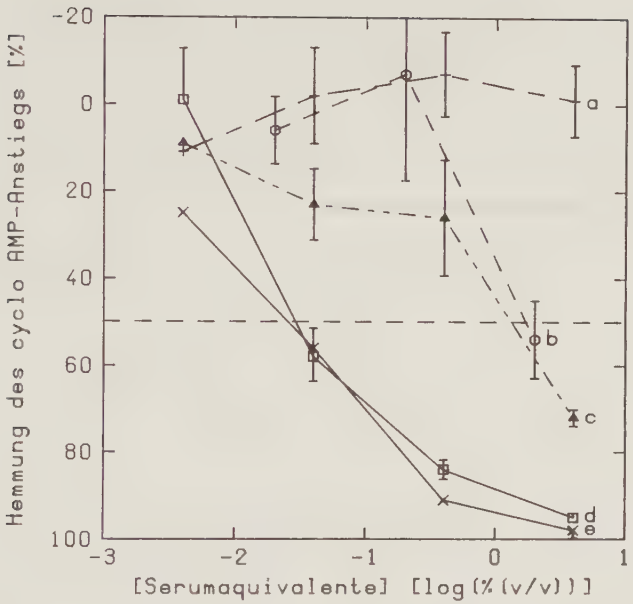


Abb. 34: Temperatureinfluß auf die Adsorption von Diabolin an Aktivkohle (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.11.)

Diabolinpräparat: Acetonpulver in K-Phosphat-Puffer (pH 7.4)

Kurve a: Eluat des Adsorbens (56 °C)

Kurve b: Rekombination der Kurven a und c

Kurve c: Kohleüberstand nach Adsorption (56 °C)

Kurve d: Kohleüberstand nach Adsorption (4 °C)

Kurve e: Kontrolle: Acetonpulver

Eine Adsorption von proteingebundener Hemmaktivität an die Kohle erfolgt erst bei erhöhter Temperatur (Abb.34). Daraus muß man schließen, daß bei diesem Prozeß eine erhebliche Aktivierungsenergie zu überwinden ist, möglicherweise zur Trennung des Diabolins von seinem Trägerprotein. Eine Desorption des Diabolins vom Adsorbens in aktiver Form gelingt weder mit Wasser, Ammoniumacetat-Puffer (0.5 mol/l, pH 6.5) (Abb.34), Essigsäureethylester, Ethanol, ethanolischer Ammoniak-Lösung [0.6 %(v/v) NH_3 / 50 %(v/v) Ethanol] oder Salzsäure (1 mol/l), weder in der Kälte noch bei 56 °C (Daten nicht gezeigt). Auch eine Rekombination der Eluate mit dem restaktiven Inkubationsüberstand ist nicht in der Lage, Hemmaktivität zurückzugewinnen (Abb.34; restliche Daten nicht gezeigt).

Die Adsorption von proteingebundenem Diabolin an Aktivkohle (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.11.) ist außer von der Temperatur auch abhängig vom pH-Wert während der Inkubation (Tab.12).

Tab. 12: Einfluß des pH-Werts einer Lösung von Acetonpulver auf die Adsorbierbarkeit von Diabolin an Aktivkohle bei 4 °C (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.1.11.)

Diabolinpräparat: gelöstes Acetonpulver

pH-Wert des Versuchsansatzes	Aktivkohle [5 mg/ml]	im Überstand verbliebene Diabolinkonzentration [bu/ml]	[%]
7	-	1510	≡ 100
7	+	700	79
3	+	142	9
3	-	van Calker, 1977	

Bereits früher wurde gezeigt, daß eine drastische Änderung der Protonenkonzentration in Abwesenheit von Adsorbens (Kontrolle) keinen Einfluß auf die biologische Hemmaktivität von proteingebundenem Diabolin hat (van Calker, 1977).

Auch bei diesem Experiment gelingt die Desorption der Hemmaktivität von der Aktivkohle nicht durch eine Änderung von pH-Wert, Ionenstärke oder Temperatur. Eine Rekombination der Eluate mit dem proteinhaltigen Überstand nach der Adsorption kann keine Hemmwirkung restaurieren (Daten nicht gezeigt).

Man muß deshalb annehmen, daß die hohe Aktivierungsenergie, die zur möglichen Trennung von Diabolin und Trägerprotein erforderlich ist, nur durch die hohe Bindungsenergie kompensiert werden kann, die bei der Bindung von Diabolin an einen anderen Träger freigesetzt wird. Eine bloße Änderung von Lösungsmittelparametern genügt offensichtlich nicht, Diabolin aus seiner Bindung an den jeweiligen Träger zu lösen (Kap. 3.6.2.).

Hier sei kurz erwähnt, daß auch kommerziell verfügbares Serumalbumin durch Inkubation im Sauren in Gegenwart von Aktivkohle seiner Diabolinaktivität verlustig geht (Daten nicht gezeigt).

3.7.4. Dialyse

Früher wurde bereits berichtet (Bashor & Saier, 1976; Hsu & Brooker, 1977; Koschel, 1977) und gezeigt (van Calker, 1977; Wagner, 1978), daß die Hemmaktivität aus Serum nicht oder nur partiell dialysierbar ist (Ausschlußgrenze 16 kg/mol).

Das ändert sich überraschenderweise auch nicht, wenn zuvor die Trägerproteine mit Proteinase K proteolytisch verdaut worden sind. Ein hydrophiles Kleinmolekül scheidet demnach für Diabolin aus (Cooper & Rodbell, 1979).

An keiner Stelle des Anreicherungsschemas (Abb. 26, S.81) läßt sich Diabolin gegen Wasser bzw. isotonische Salzlösung in Abwesenheit eines externen Proteinakzeptors dialysieren (Daten nicht gezeigt). Dieses Verhalten kann möglicherweise durch Micellenbildung oder aber dadurch erklärt werden, daß Diabolin noch an Proteine oder Peptide im Dialyseschlauch gebunden ist, die diesen nicht verlassen können. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß proteinfreies Diabolin an das Cellulosegel des Cellophan-Dialyseschlauches selbst bindet.

Die Versuche, bei denen fap-HSA [1 %(w/v)] im Dialysat zugegen ist, sind im Ergebnis nicht immer eindeutig (Daten nicht gezeigt). Es wird zwar in jedem Fall ein deutlicher Verlust an Hemmaktivität beobachtet, der Dialyseeffekt unter diesen Bedingungen liegt jedoch weit unter den theoretisch zu erwartenden Verlusten. Es wäre denkbar, daß Diabolin noch an kleine bis mittlere Peptidbruchstücke gebunden ist (Meisner, 1980). Aber erst bei einer Kettenlänge von etwa 150 Aminosäuren wird eine Molekularmasse erreicht, die der Ausschlußgrenze des Dialyseschlauches (7.3.9.) entspricht. Eine letztendliche Erklärung für dieses unerwartete Verhalten von proteinfreiem Diabolin bei der Dialyse bleibt Untersuchungen mit dem hochgereinigten Faktor vorbehalten.

3.7.5. Veresterung

Es ist denkbar, daß es sich bei Diabolin um ein Phospho- und/oder Glykolipid handelt (Kap. 3.5.2.3.). Eine basenkatalysierte Ver- bzw. Umesterung unter milden Bedingungen mit alkaligesättigtem Methanol wäre in beiden Fällen in der Lage, das Molekül in einen hydrophilen und hydrophoben Teil zu spalten. Beide potentiellen Bruchstücke werden durch Zusatz von Chloroform getrennt (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.3.1.).

Die Hemmaktivität verbleibt bei einer Kontrollinkubation ohne Hydroxidzusatz zum überwiegenden Teil in der hydrophilen Phase (Abb.35, Kurve c). Durch die Methanolyse im Alkalischen geht diese Aktivität jedoch verloren (Abb.35, Kurve b).

Gleiches geschieht mit der geringen Teilaktivität (20 %) in der Chloroformphase bei Zusatz von Alkali (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Experimente kann nicht streng ausgeschlossen werden, daß es sich bei den Hemmaktivitäten in der hydrophilen und -phoben Phase um zwei verschiedene Spezies handelt. Der Umstand jedoch, daß durch die gleiche Behandlung die Aktivität in beiden Phasen zum Erliegen kommt, läßt vermuten, daß es sich bei der Verteilung der Diabolinaktivität in beiden Phasen um die Ausbildung eines Phasengleichgewichts handelt.

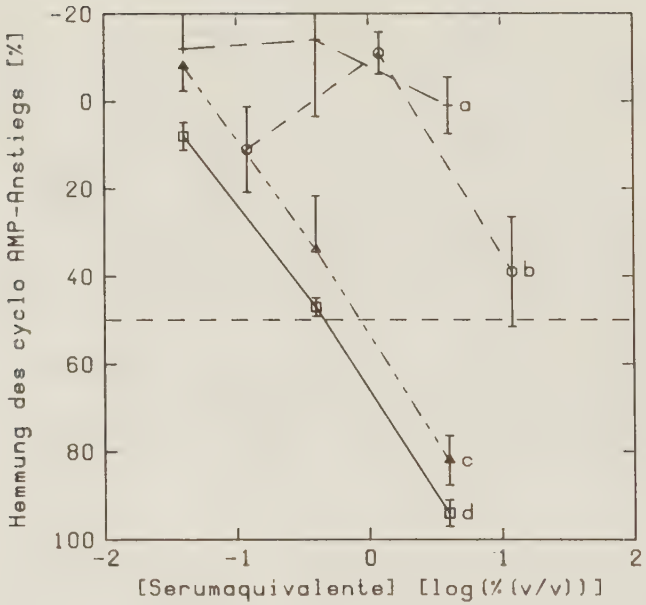


Abb. 35: Auswirkung von Veresterung im Alkalischen auf die Hemmaktivität von Diabolin (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.3.1.).

Diabolinpräparat: Methanoleluat der Kieselgelsäule (Kap. 3.5.1.2.)

Kurve a: Kontrolle: fap-HSA

Kurve b: Diabolin nach Behandlung + fap-HSA

Kurve c: Kontrollinkubation: Diabolin + fap-HSA

Kurve d: Kontrolle: Diabolin + fap-HSA

3.7.6. Dansylierung

Um festzustellen, ob Diabolin eine für seine biologische Aktivität notwendige, freie Aminogruppe trägt, wird Diabolin mit Dansylchlorid umgesetzt und die Restaktivität bestimmt (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.3.2.).

Diabolin besitzt keine für Dansylchlorid zugängliche, freie Aminogruppe, deren Modifizierung einen Verlust an biologischer Aktivität zur Folge hat (Tab.13).

Tab. 13: Einfluß von Dansylchlorid auf die Hemmaktivität von proteinfreiem Diabolin (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.3.2.).
Diabolinpräparat: Methanolextrakt aus Acetonpulver (Kap. 3.5.2.2.)

Probe in MeOH	Behandlung	Diabolinkonzentration [bu/ml]	[%]
Diabolin	unbehandelt	7780	=100
Diabolin	Aceton	7870	101
Diabolin	Dansylchlorid im Aceton	7280	94
MeOH	Dansylchlorid im Aceton	31	0.4

Das bedeutet jedoch nicht, daß das Molekül keinerlei Aminogruppierung aufweist. Eine quartäre Ammoniumgruppe z.B. wie im Phosphatidylcholin würde sich einer Dansylierung entziehen.

3.7.7. Sonstiges

Diabolin ist im Sauren (1 mol/l HCl) ohne Verluste lyophilisierbar. Weder in proteinfreier noch -gebundener Form ist die biologische Aktivität durch längere Ultraschallbehandlung (2 x 60 s) zu beeinträchtigen.

Diabolin ist in proteingebundener Form ohne Verluste durch Polycarbonat- bzw. Nitrocellulosefilter keimfrei zu erhalten.

3.7.8. Zusammenfassung

1. Proteinfreies Diabolin ist bei neutralem pH-Wert in wässeriger Lösung kochstabil.

2. Proteinfreies Diabolin ist in der Hitze säurelabil.

3. Proteingebundenes Diabolin bindet effektiv an Aktivkohle. Diese Bindung ist positiv abhängig von der Temperatur und der Protonenkonzentration des Inkubationsmediums. Eine Rückgewinnung des aktiven Diabolins von der Holzkohle ist bisher nicht gelungen.

4. Proteingebundenes Diabolin ist nicht dialysierbar. Eine quantitative Dialyse des proteinfreien Diabolins ist auch in Gegenwart eines externen Trägerproteins im Dialysat nicht möglich.

5. Die Hemmaktivität des Diabolins wird durch methanolische Ver- und/oder Umesterung im Alkalischen zerstört.

6. Die biologische Hemmaktivität von proteinfreiem Diabolin ist durch Behandlung mit Dansylchlorid nicht zu beeinträchtigen.

3.8. Biochemische Charakterisierung

3.8.1. Enzymbehandlung

Einen wichtigen Hinweis auf die Natur von Diabolin bieten Verdauungsversuche mit spezifischen Enzymen. Ein prinzipielles Problem bei all diesen Untersuchungen mit Zusatz von Fremdproteinen besteht darin, daß Diabolin auch an diese Enzyme bindet (Kap. 3.5.1.1.). Müssen die Enzyme nach Beendigung der Inkubation abgetrennt werden, um eine Störung des biologischen Testsystems zu vermeiden, können dadurch artifizielle Verluste entstehen und so eine Sensitivität des Diabolins gegenüber dieser enzymatischen Aktivität vorgetäuscht werden.

3.8.1.1. Proteasen

Unterwirft man ein proteinhaltiges Diabolinpräparat einer Proteolyse durch geringe Mengen Trypsin (300 µg/ml) und beendet die Inkubation durch Zusatz eines Trypsininhibitors (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.2.2.), so werden mit zunehmender Inkubationsdauer immer geringere Hemmaktivitäten im Versuchsansatz gemessen (Tab.14).

Tab. 14: Kinetik des Aktivitätsverlustes proteingebundenen Diabolins bei Behandlung mit Trypsin [0.3 mg/ml] (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.2.2.).

Diabolinpräparat: Acetonpulver in 50 mmol/l Tris-Puffer (pH 7.5, 37 °C)

Trypsin [0.3 mg/ml]	Inkubationszeit [h]	Diabolinkonzentration [bu/ml]	[%]
-	0	2650	=100
+	0.5	1290	49
+	1	593	22
+	2	429	16
+	3	183	7
-	3	2200	84

Ein analoges Ergebnis war bereits mit Proteinase K erhalten worden (Kap. 3.5.1.1.). Vermutlich ist der Aktivitätsverlust nach Trypsinbehandlung genauso durch Zusatz von Serumalbumin rückgängig zu machen wie nach Behandlung mit Proteinase K und Pepsin (Abb.36).

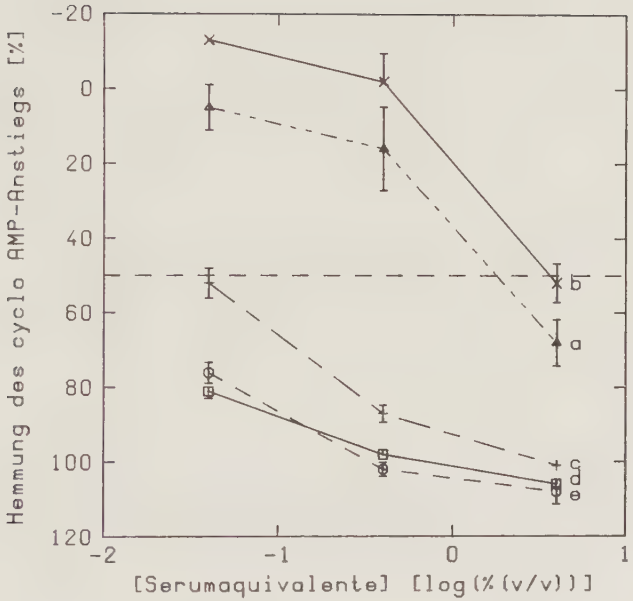


Abb. 36: Einfluß von Pepsin (0.5 mg/ml) auf die Hemmaktivität von Diabolin (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.2.3.).

Diabolinpräparat: Acetonpulver

Kurve a: Kontrolle: fap-HSA

Kurve b: Kontrolle: inaktiviertes Pepsin (0.5 mg/ml)

Kurve c: proteinhaltiges Diabolinpräparat nach Pepsinverdauung (0.5 mg/ml)

Kurve d: proteinhaltiges Diabolinpräparat nach Pepsinverdauung + fap-HSA

Kurve e: Kontrollinkubation: Diabolin

3.8.1.2. Andere Enzyme

3.8.1.2.1. Phosphatasen

Die Behandlung von proteingebundenem Diabolin mit Saurer wie mit Alkalischer Phosphatase führt zu einer Zerstörung seiner Hemmaktivität (van Calker, 1977; Wagner, 1978). In all diesen Versuchen wird die Enzymbehandlung durch Kochen der Inkubationsmischung in einem Wasserbad abgebrochen und anschließend zentrifugiert. Bei diesem Vorgehen kann nicht ausgeschlossen werden, daß Diabolin von der zugesetzten Phosphatase in den Niederschlag mitgerissen wird.

Um diese Frage zu klären, wird die Behandlung mit Alkalischer Phosphatase (Aktivitätsoptimum bei pH 9.8) durch Zusatz von Salzsäure beendet [pH 6; Gerbitz et al., 1977] und anschließend die Hemmaktivität gemessen. Auch unter diesen Bedingungen führt die Inkubation von proteingebundenem Diabolin mit Alkalischer Phosphatase zu einem Verlust an biologischer Hemmaktivität von über 90 % (Daten nicht gezeigt; Wagner, 1978; experimentelle Einzelheiten unter 7.4.2.4.). Es kann dabei ausgeschlossen werden, daß Diabolin durch eine die Phosphatase verunreinigende Fremdaktivität angegriffen wird, da identische Ergebnisse auch mit einer höchstgereinigten Präparation aus menschlicher Leber (Gerbitz, 1977; Gerbitz et al., 1977) gewonnen werden (Daten nicht gezeigt). Es wäre aber auch denkbar, daß lediglich für die Bindung von Diabolin an sein jeweiliges Trägerprotein auf diesem freie Phosphatgruppen erforderlich sind, dort von der Phosphatase abgespalten und damit die Bindung von Diabolin an sein Trägerprotein unterbunden wird. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wird

das Experiment mit proteinfreiem Diabolin wiederholt. Nach einer 3 h langen Inkubation von Diabolin mit Alkalischer Phosphatase (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.2.4.) wird nach Reaktivierung des Hemmfaktors mit fap-HSA ebenfalls nur noch ein Bruchteil der Ausgangsaktivität gefunden (Tab.15).

Tab. 15: Einfluß Alkalischer Phosphatase auf die Hemmaktivität proteinfreien Diabolins, gemessen nach anschließender Reaktivierung mit fap-HSA [6 %(w/v)] (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.2.4.).

Diabolinpräparat: Methanoleluat der Kieselgelsäule (Kap. 3.5.1.2.)

Diabolin	Inkubationspuffer (pH 9.8)	Alk.Phosphatase [0.5 mg/ml]	Diabolinkonzentration [bu/ml]	[%]
+	-	-	2330	=100
+	+	-	1620	69.4
+	+	+	229	9.8
-	+	+	201	8.6

Dieser Befund beweist, daß die Phosphatase direkt das Diabolin angreift. Man muß daraus schließen, daß Diabolin eine für seine biologische Aktivität notwendige Phosphatesterbindung besitzt.

Diese essentielle Phosphatgruppe erschließt die Möglichkeit der späteren radioaktiven Markierung von Diabolin durch Rephosphorylierung. Ein radioaktiv markiertes Substrat aber ist eine wichtige Voraussetzung für seine Identifizierung im Gewebe und damit für die Aufklärung seiner biologischen Bedeutung.

Der Vorteil, den ein radiochemisch markierter Tracer für die Isolierung, Identifizierung und Quantifizierung unter Umgehung des biologischen Testsystems böte, wäre kaum zu überschätzen.

3.8.1.2.2. Phospholipase C

Die Ergebnisse der Behandlung von Diabolin mit Phosphatase (Kap. 3.8.1.2.1.) lassen vermuten, daß es sich bei Diabolin um ein Phospholipid handeln könnte. Um diese Annahme zu überprüfen, wird Diabolin einer Behandlung mit Phospholipase unterworfen. Phospholipase C spaltet den Phosphorsäure-Glycerinester von Phospholipiden (MacFarlane & Knight, 1941).

Proteinfreies Diabolin wird durch Phospholipase C in seiner Hemmaktivität deutlich geschwächt (Tab.16). Der größte Teil der reproduzierbar nicht zerstörten Restaktivität (15 - 25 %) wird nach Aufarbeitung des Ansatzes in der Chloroformphase und nicht in der wässerigen Phase wiedergefunden (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.2.6.).

Die Schwächung der Hemmaktivität ist auf die Enzymaktivität selbst zurückzuführen und nicht auf etwaige unspezifische Adsorption an das Enzymprotein. Wäre letzteres der Fall, müßte die verbliebene Hemmaktivität in der hydrophilen Phase wiedergefunden werden, wo sich das Enzym nach der Inkubation befindet. Das ist jedoch nicht der Fall (Tab.16). Auch der Befund, daß die Diabolinaktivität nach kurzzeitiger Inkubation (unter 15 s) mit Phospholipase C nicht nennenswert beeinträchtigt wird (Daten nicht gezeigt), widerlegt die Annahme von der unspezifischen Proteinadsorption in diesem speziellen Fall.

Tab. 16: Einfluß von Phospholipase C auf die Hemmaktivität proteinfreien Diabolins, gemessen nach anschließender Reaktivierung mit fap-HSA 6 %(w/v) (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.2.6.).

Diabolinpräparat: Methanoleluat der Kieselgelsäule (Kap. 3.5.1.2.).

Diabolin	Phospholipase C [0.3 mg/ml]	Phase, in der Diabolin-aktivität gemessen wird	Diabolinkonzentration [bu/ml]	[%]
+	-	$CHCl_3$	4710	=100
+	+	$CHCl_3$	837	18
+	+	$MeOH/H_2O$	247	5
-	+	$MeOH/H_2O$	203	4
-	+	$CHCl_3$	186	4

Mehrere Erklärungsmöglichkeiten für diese Ergebnisse stehen zur Wahl. Entweder zeigt das lipophile Bruchstück nach der Spaltung noch einen definierten, wenn auch deutlich geringeren biologischen Hemmeffekt auf die hormonell stimulierte cyclo AMP-Anhäufung in den Zellen, oder aber der Hemmeffekt wird durch mindestens zwei Faktoren hervorgerufen, die sich in ihrer Lipophilie unterscheiden. Beide Faktoren wären zwar einer Ver-/Umesterung im Alkalischen zugänglich (Kap. 3.7.5.), nur die wasserlösliche Komponente jedoch könnte durch Phospholipase C gespalten werden. Eine dritte Erklärungsmöglichkeit besteht in der Annahme eines Phasengleichgewichts von Diabolin (Kap. 3.7.5.), wobei nur der Anteil, der sich während der Inkubationszeit in der hydrophilen Phase befindet oder dort hingelangt, vom Enzym inaktiviert werden kann.

3.8.1.2.3. Neuraminidase

Viele Proteine, insbesondere kochstabile (de Haas et al., 1971; Schwick et al., 1977), tragen glykosidische Seitenketten.

N-Acetylneuraminsäure bildet oft den Abschluß der glykosidischen Seitenketten in diesen Proteinen. Um zu klären, ob Diabolin selbst bzw. seine Trägerproteine für ihre diesbezügliche biologische Funktion notwendige Neuraminsäuren tragen, wird der proteingebundene Hemmfaktor mit Neuraminidase behandelt. Neuraminidase spaltet spezifisch N-Acetylneuraminylreste aus glykosidischer Bindung (Tallman & Brady, 1972). Die Behandlung des proteingebundenen Diabolins

mit Neuraminidase (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.2.5.) führt zu keinem quantitativen Verlust an Hemmaktivität (Tab.17).

Tab. 17: Einfluß von Neuraminidase auf die Hemmaktivität proteingebundenen Diabolins (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.2.5.).

Diabolinpräparat: Acetonpulver

Diabolin	Inkubationszeit [h]	Neuraminidase [100 U/ml]	Diabolinkonzentration [bu/ml]	[%]
+	0	-	2920	=100
+	3	-	2970	102
+	3	+	1210	41,5
-	3	+	57	1,9

Wenn die Enzymaktivität am Ende der Inkubation durch Kochen (2 min; 96 °C) zerstört wird, ändert sich der erhobene Befund nicht. Diabolin wird nur partiell inaktiviert, die Restaktivität gegenüber der Kontrolle beträgt in diesem Fall 30 % (Daten nicht gezeigt).

Eine schlüssige Erklärung für dieses Verhalten von Diabolin bei Behandlung mit Neuraminidase kann bisher nicht geboten werden, sie wird Untersuchungen am hochgereinigten Faktor vorbehalten bleiben. Eine einfache und allübliche Interpretation solcher Phänomene besteht in der Erhöhung der Anzahl der zu postulierenden Wirkfaktoren. Solange jedoch die Reindarstellung eines Faktors noch nicht gelungen ist, stehen solche Überlegungen auf sehr unsicherem Boden.

3.8.2. Denaturierung

Ein wichtiges Kriterium zur Charakterisierung von Diabolin ist sein Verhalten gegen denaturierende bzw. kovalente Bindungen spaltende Agentien. Die Hemmwirkung proteingebundenen Diabolins auf die hormonell stimulierbare cyclo AMP-Anhäufung wird durch Erhitzung in 0.75 mol/l Tris-Puffer (pH 6.8) (5 min; 75 °C) in Gegenwart von Mercaptoethanol (Endkonzentration 0.64 mol/l), Harnstoff (9 mol/l) und SDS (2 %(w/v)) [entsprechend einem Spaltansatz für SDS-Polyacrylamid-Gele] nicht beeinträchtigt (Abb.37).

Sämtliche Proben und Kontrollen werden nach der Spaltung vor dem Einsatz im biologischen Testsystem extensiv dialysiert, die ersten 12 h gegen Wasser bei Raumtemperatur, anschließend bei 4 °C gegen PBS/Azid.

Das gleiche Ergebnis wird erhalten, wenn bei der Spaltung der Hitzeschritt entweder verlängert (30 min; 75 °C), bzw. die Temperatur (5 min; 96 °C) oder die Protonenkonzentration (zusätzlich 1 mol/l Glycin-HCl; pH 1.5) erhöht wird (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund dieser Ergebnisse kann man ausschließen, daß es sich bei Diabolin um ein Protein handeln könnte (Kap. 3.7.4. und 3.6.3.8.). Auch eine mögliche langsame Rückfaltung des Proteins im Laufe der anschließenden Dialyse ist unwahrscheinlich, da auch erst kurz (15 s) vor dem Aktivitätstest stark verdünnte Spaltproben keine nennenswerten Hemmverluste aufweisen (Daten nicht gezeigt). Weiter kann man aus den Befunden schließen, daß Diabolin auch unter stark denaturierenden Bedingungen nicht dialysierbar wird und als Trägerprotein möglicherweise auch entfaltete Proteinketten akzeptiert.

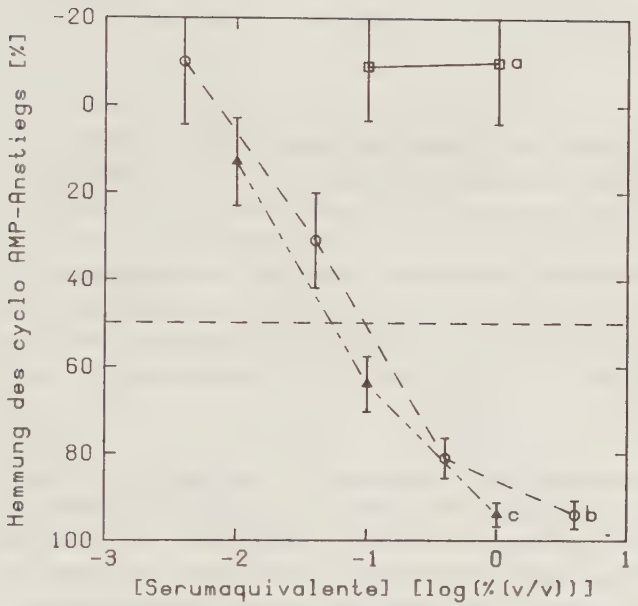


Abb. 37: Einfluß denaturierender und kovalente Bindungen spaltender Reagentien auf die Hemmaktivität von proteingebundenem Diabolin (Endkonzentration 0.64 mol/l Mercaptoethanol, 9 mol/l Harnstoff, 2 %(w/v) SDS, 0.75 mol/l Tris-Puffer (pH 6.8), 0.25 Seq) (5 min; 75 °C). Die denaturierten Proben werden über Nacht dialysiert.

Diabolinpräparat: Acetonpulver in Wasser

Kurve a: Kontrolle: Retentat des Spaltreagens

Kurve b: Retentat nach Dialyse des behandelten Diabolins

Kurve c: Kontrolle: Retentat des Diabolins

3.8.3. Spezifische Spaltungen

Bromcyan spaltet eine Peptidkette spezifisch bei Methionin. Die Behandlung von proteingebundenem Diabolin mit BrCN (positive Kontrolle mit Met--Enkephalin, negative Kontrolle mit Leu-Enkephalin) hat keinerlei Einfluß auf die Hemmaktivität des Serumfaktors (Daten nicht gezeigt, experimentelle Einzelheiten unter 7.4.3.3.). Dieser Befund ist ein weiterer Hinweis darauf, daß die Integrität des Trägerproteins für die biologische Hemmwirkung von Diabolin verzichtbar ist.

Periodat ist in der Lage, Zucker mit cis-Diol-Konfiguration (bzw. Aminozucker) spezifisch oxidativ zu öffnen. Entsprechende Spaltungsversuche an proteingebundenem Diabolin mit bis zu 0.16 mmol/l Periodat haben bis zu einer maximalen Inkubationsdauer von 49 h keinerlei Auswirkungen auf die Hemmaktivität (Daten nicht gezeigt, experimentelle Einzelheiten unter 7.4.3.4.). Man muß daraus schließen, daß Diabolin in proteingebundener Form keine für die biologische Hemmaktivität notwendige und für Periodat zugängliche cis-Diol-Gruppierung aufweist.

3.8.4. Zusammenfassung

1. Diabolin ist kein Protein.

2. Die Wirkung von Proteasen auf Diabolin beschränkt sich auf die Zerstörung des für seine biologische Hemmwirkung unverzichtbaren Trägerproteins.

3. Das Trägerprotein kann seine Funktion auch in denaturiertem Zustand erfüllen. Seine Funktion wird durch eine Spaltung infolge einer BrCN-Behandlung nicht eingeschränkt.

4. Diabolin besitzt keine für seine biologische Funktion notwendige, mit Periodat oxidierbare cis-Diol-Gruppierung.

5. Die Hemmwirkung des proteinfreien Diabolins ist sensitiv gegen Alkalische Phosphatase, jedoch nur partiell zu unterdrücken mit Phospholipase C und Neuraminidase.

6. Auch unter stark denaturierenden Bedingungen wird proteingebundenes Diabolin nicht dialysierbar.

3.9. Hinweise auf den Wirkmechanismus

Die wesentlichen Komponenten der Vogelerythrocytenmembran, die nach Stimulierung des adrenergen ß-Rezeptors an der Signalverarbeitung und -weiterleitung bis hin zur Adenylatcyclase beteiligt sind, konnten weitgehend charakterisiert und wechselseitig rekombiniert werden (Howlett et al., 1979; Citri & Schramm, 1980; Eimerl et al., 1980). Eine Schlüsselstellung nimmt dabei das sog. G/F-Protein (Pfeuffer, 1977) ein, das sowohl eine GTP-Hydrolaseaktivität (Cassel & Selinger, 1977), als auch Bindungsstellen für Fluoridionen (Perkins,1973) und Choleratoxin (Moss & Vaughan, 1979) aufweist. An irgendeiner Stelle dieses Systems muß Diabolin als Hemmstoff eingreifen.

Bereits früher konnte gezeigt werden, daß Diabolin nicht als Antagonist am Rezeptor fungiert (van Calker, 1977; Wagner, 1978). Die Diabolinwirkung geschieht auch nicht über eine Stimulation zusätzlicher hemmender adrenerger Rezeptoren des α_2-Typs (Wagner, 1978). Daraus muß man schließen, daß Diabolin direkt in die Signalkaskade von nicht hemmenden Rezeptoren eingreift.

In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß für Prostaglandin E_1, dessen stimulierende Wirkung auf Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen ebenfalls unterdrückt wird, bisher weder ein Rezeptor noch ein Antagonist beschrieben wurde. Diabolin scheint bisher das erste und einzige physiologische Agens zu sein, das eine Hemmung der durch Prostaglandin E_1 stimulierten cyclo AMP-Synthese bewirkt, ohne bereits beschriebene,

hemmende Rezeptoren zu benutzen. Unabhängig davon ist Diabolin das einzig bekannte, die cyclo AMP-Synthese hemmende Agens in Ratten-Gliomazellen C6.

3.9.1. Hemmeffekt auf die Neusynthese von cyclo AMP

Es wäre denkbar, daß Diabolin die Permeabilität der Zellmembran für cyclo AMP drastisch erhöht (Moolenaar et al., 1979; Bartholow & Geyer, 1982) und dadurch eine Hemmung der Neusynthese von intrazellulärem cyclo AMP nach hormoneller Stimulation vortäuscht (Drainas et al., 1981). Um diesen Mechanismus auszuschließen, wird der Gehalt an cyclo AMP intra- wie extrazellulär in Abhängigkeit von der Serumkonzentration im Inkubationsmedium während der hormonellen Stimulation bestimmt. Diabolin hat keinen Einfluß auf die Permeabilität der Plasmamembran für cyclo AMP (Tab.18).

Ein in etwa gleichbleibender Anteil der intrazellulären Menge an cyclo AMP wird ins Medium abgegeben (Tab.18). Die hemmende Wirkung von Diabolin kann deshalb auch im Extrazellulärraum nachgewiesen werden. Die intra- wie extrazellulär errechneten prozentualen Hemmungen der Grundstimulation zeigen in ihrem konzentrationsabhängigen Verlauf keine gravierenden Unterschiede (Tab.18).

Tab. 18: Einfluß von Diabolin auf die Permeabilität der Plasmamembran von Gliomazellen für cyclo AMP.

Serum-aquiva-valente [- log (%(v/v))]	cyclo AMP-Gehalt intrazellulär [pmol/mg Protein]	Hemmung [%]	cyclo AMP-Gehalt extrazellulär [pmol/mg Protein]	Hemmung [%]	cyclo AMP-Anteil [% des Gesamt-cyclo AMP]
∞	2980 ± 111	0	587 ± 135	0	16
4.7	2590 ± 30	13	528 ± 36	10	17
3.7	2320 ± 163	22	562 ± 26	4	20
2.7	1980 ± 74	34	492 ± 7	16	20
1.7	1110 ± 46	63	243 ± 31	59	18
0.7	462 ± 47	85	121 ± 2	79	21
-0.3	230 ± 26	92	100 ± 11	83	30

3.9.2. Hemmeffekt auf die Basisaktivität

Um den Angriffspunkt eines Inhibitors innerhalb einer Sequenz von Folgereaktionen einzugrenzen, ist es notwendig, die Wirkung des Hemmstoffes auf die Teilreaktionen zu untersuchen.

Beide Teilsysteme, Rezeptor wie Adenylatcyclase-System, können unabhängig voneinander frei in der Plasmamembran diffundieren (Citri & Schramm, 1980) und zeigen ohne Hormon nur eine geringe Bindungsaffinität zueinander (Limbird et al., 1980).

Diabolin hemmt bereits die Basisaktivität von Gliomazellen, die in serumfreiem Medium gezüchtet werden (Abb.38). Dieser Befund kann nur in Gegenwart eines Phosphodiesterase-Hemmers erhoben werden, da die Basisaktivität der Zellen nach Anzucht in Abwesenheit von Serum gegenüber den in serumhaltigem Kulturmedium gezüchteten Kontrollzellen drastisch abfällt (Wagner, 1978).

Bemerkenswert ist dabei, daß dieser Hemmeffekt an denselben Zellen nach Anzucht in serumhaltigem Medium nicht auftritt (van Calker, 1977), was aber zwanglos durch die verminderte Sensitivität der Zellen gegenüber Diabolin unter diesen Wachstumsbedingungen erklärt werden kann.

Aus der Tatsache, daß Diabolin bereits die Basisaktivität unterdrückt, kann man schließen, daß die Hemmwirkung des Serumfaktors unabhängig ist von der Kopplung zwischen stimuliertem Rezeptor und Adenylat-

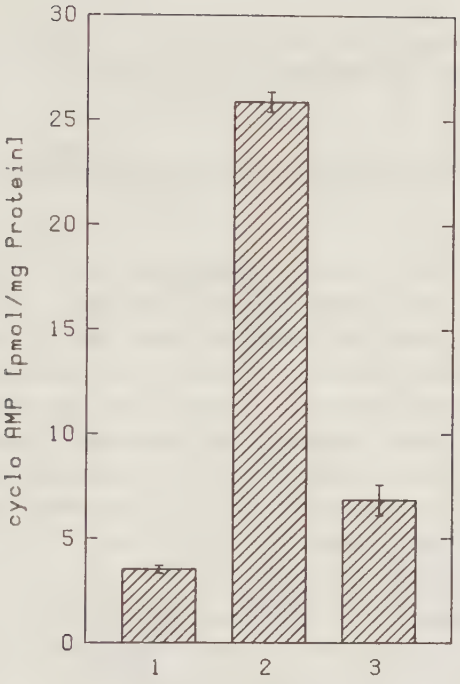


Abb. 38: Einfluß von Diabolin auf die Basisaktivität der Adenylatcyclase.

Zellprotein/Schale (Durchmesser 80 mm): 1.4 mg

Diabolinpräparat: reaktiviertes Methanolextrakt der Kieselgelsäule (Kap. 3.5.1.2.).

Inkubationsbedingungen: 10 min, 37 °C

Säule 1: ohne Zusatz

Säule 2: 0.2 mmol/l ZK 62 711

Säule 3: 0.2 mmol/l ZK 62 711 + Diabolin (4 %(v/v) Seq)

cyclase-System. Der Ansatzpunkt für Diabolin muß also stromabwärts vom Rezeptor gesucht werden.

3.9.3. Hemmeffekt bei Choleratoxin-Stimulation

Das G/F-Protein des Adenylatcyclase-Systems trägt eine GTPase-Aktivität (Cassel & Selinger, 1977). Choleratoxin bewirkt durch die Übertragung eines ADP--Ribosylrestes auf das G/F-Protein eine Hemmung der GTPase und damit ein "Einfrieren" der Adenylatcyclase in einer permanent aktiven Form (Cassel & Pfeuffer, 1978). Um Einblick in den Mechanismus und den Angriffspunkt von Diabolin zu gewinnen, muß die Hemmwirkung von Diabolin auf die rezeptorfrei aktivierte Cyclase untersucht werden.

Die Anwesenheit von Serum während der Anzucht der Zellen steigert die Wirksamkeit von Choleratoxin auf diese Zellen um ein Vielfaches (Abb.39).

Eine mögliche Ursache für die geringere, eventuell auch nur langsamere, Stimulierbarkeit der Zellen nach Anzucht in serumfreiem Medium liegt in einer Veränderung der Plasmamembran der Zellen, insbesondere in einer Verarmung an dem spezifischen Akzeptorgangliosid für Choleratoxin G_{M1} (van Heyningen, 1974) [eine wesentlich über zwei Stunden hinausgehende Inkubationszeit führt zu Sterilitätsproblemen]. Es könnte aber auch nach Anzucht der Gliomazellen in serumfreiem Medium ein cytosolischer, aktivierender Faktor fehlen (Enomoto & Gill, 1980).

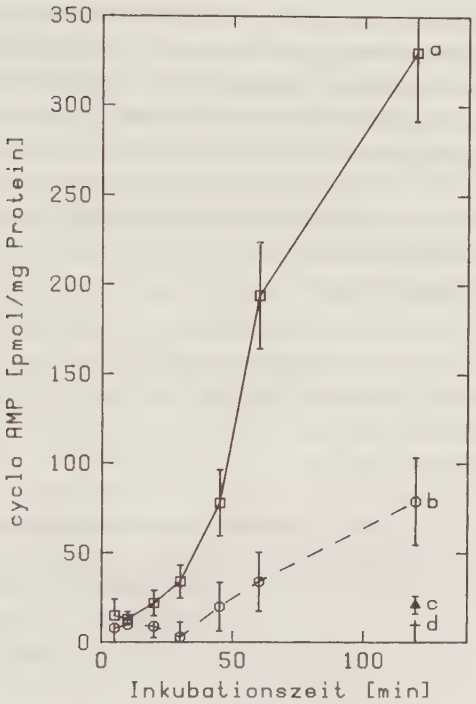


Abb. 39: Einfluß des Serumgehaltes im Anzuchtmedium auf die spätere Stimulierbarkeit der Zellen durch Choleratoxin (5 µg/ml) (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.4.2.).

Zellprotein/Schale (Durchmesser 60 mm): 0.27 mg

Kurve a: Anzucht in FCS(10 %(v/v))-Medium

Kurve b: Anzucht in serumfreiem Medium

Lösungsmittelkontrollen:

Punkt c: Anzucht in FCS(10 %(v/v))-Medium

Punkt d: Anzucht in serumfreiem Medium

Die andere Möglichkeit, eine Hemmung der intrazellulären cyclo AMP-Neusynthese vorzutäuschen, besteht in einer Aktivierung (Strewler & Manganiello, 1979) der entsprechenden Phosphodiesterase (Butcher & Sutherland, 1962). Um diese Möglichkeit auszuschließen, wird die Hemmwirkung von Diabolin auf die hormonell stimulierte cyclo AMP-Synthese in Gegenwart des Phosphodiesterase--Hemmers ZK 62 711 gemessen.

Die durch Diabolin verursachte Hemmung der intrazellulären cyclo AMP-Anhäufung ist unabhängig von der Aktivität der Phosphodiesterase (Tab.19). Die Hemmung bleibt abhängig von der Konzentration des Serums im Inkubationsmedium (Tab.19).

Tab. 19: Einfluß eines Phosphodiesterase-Hemmers (ZK 62 711) auf die Hemmwirkung von Diabolin. Der Blocker wird zur Endkonzentration (0.2 mmol/l) im Inkubationsmedium gelöst.

Diabolin [%(v/v)Seq]	ZK 62 711 [0.2 mmol/l]	cyclo AMP-Gehalt [pmol/mg Protein]	rel. Hemmung [%]
0	-	1050 ± 75	0
0	+	3800 ± 406	0
0.02	-	620 ± 67	41
0.02	+	2680 ± 123	30
2	-	210 ± 21	80
2	+	788 ± 159	79

Aus diesen Ergebnissen folgt, daß Diabolin direkt die Neusynthese von intrazellulärem cyclo AMP hemmend beeinflußt.

Analog zu den Verhältnissen in Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen (Propst, 1981) wird ein Maximum des intrazellulären cyclo AMP-Gehalts nach etwa 70 min Choleratoxininkubation beobachtet, während der extrazelluläre cyclo AMP-Gehalt nach einer Verzögerungsphase von annähernd 50 min konstant ansteigt (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund ist nur durch eine starke Permeabilitätserhöhung der Plasmamembran für cyclo AMP nach 70 min zu erklären (Cuatrecasas, 1973).

Obwohl bei serumfrei gezüchteten Testzellen eine wesentlich erhöhte Sensitivität gegenüber Diabolin zu erwarten wäre (Kap. 3.1.3.1.), werden alle weiteren Experimente mit Choleratoxin an Zellen durchgeführt, die in Anwesenheit von Serum kultiviert worden sind (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.4.2.). An diesen Zellen sollte eine etwaige geringere Hemmung durch Diabolin wegen der wesentlich höheren Grundstimulation leichter nachzuweisen sein als an Zellen, die in Abwesenheit von Serum gezüchtet wurden. In Abb.40 wird der zeitliche Verlauf der cyclo AMP--Produktion in An- und Abwesenheit von Serum im Inkubationsmedium verglichen. Eine dritte Kurve zeigt den Gehalt an gesamtem cyclo AMP, wenn der Hemmfaktor (Serum) erst 45 min nach Inkubationsbeginn zugesetzt wird.

In beiden Fällen, in denen sich Diabolin im Inkubationsmedium befindet, wird eine etwa 50 %ige Hemmung gegenüber der Kontrolle beobachtet. Diese Hemmwirkung tritt allerdings erst sehr spät auf (Abb. 40). Nach der immer zu beobachtenden Verzögerungsphase

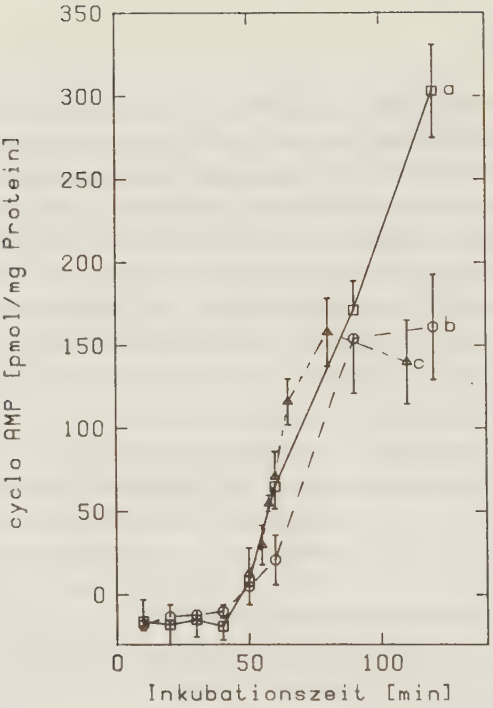


Abb. 40: Einfluß von Diabolin auf die durch Cholera-toxin (5 µg/ml) stimulierbare cyclo AMP--Bildung (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.4.2.).

Zellprotein/Schale (Durchmesser 60 mm): 0.24 mg

Diabolinpräparat: Acetonpulver in PBS (Seq)

Kurve a: ohne weiteren Zusatz

Kurve b: Diabolinzusatz 4 %(v/v) bei Inkubationsbeginn

Kurve c: Diabolinzusatz 4 %(v/v) nach 45 min

setzt die Choleratoxinwirkung gleich stark ein, unabhängig davon, ob Serum zugegen ist oder nicht. Die üblicherweise sofort nach Diabolinzugabe meßbare Hemmung der cyclo AMP-Bildung (Kap. 3.9.5.) bleibt also in choleratoxinbehandelten Zellen aus.

In Kapitel 3.9.2. wurde gezeigt, daß Diabolin in den Informationsfluß jenseits des Rezeptors eingreift. Das Fehlen der sofortigen Hemmwirkung von Serum in toxinstimulierten Zellen weist auf das G/F-Protein als möglichen Angriffspunkt des Diabolins hin.

Erst nach ca. 90 min zeigt sich eine Wirkung des Serumzusatzes in einer Hemmung des weiteren cyclo AMP-Anstiegs. Dieser Effekt ist invariant gegenüber dem Zeitpunkt des Serumzusatzes innerhalb der ersten 45 min. Die Entscheidung, ob diese Hemmung von Diabolin oder einer anderen Serumkomponente verursacht wird, muß Versuchen mit gereinigtem Diabolin vorbehalten bleiben.

3.9.4. Reversibilität des Hemmeffektes

Greift ein Effektor in ein Reaktionsgeschehen durch kovalente Modifikation eines der Reaktionspartner ein (Anderson et al., 1979b), wie z.B. im Falle der Wirkung von Choleratoxin gezeigt, so ist der Effekt nicht oder nur relativ langsam reversibel. Um in dieser Hinsicht Einblick in die Wirkungsweise von Diabolin auf das stimulierte System zu gewinnen, wird die Reversibilität der verursachten Hemmung untersucht.

Serumfrei kultivierte Gliomazellen werden 5 min lang mit reaktiviertem Diabolin [Serumäquivalente: 4 %(v/v)]

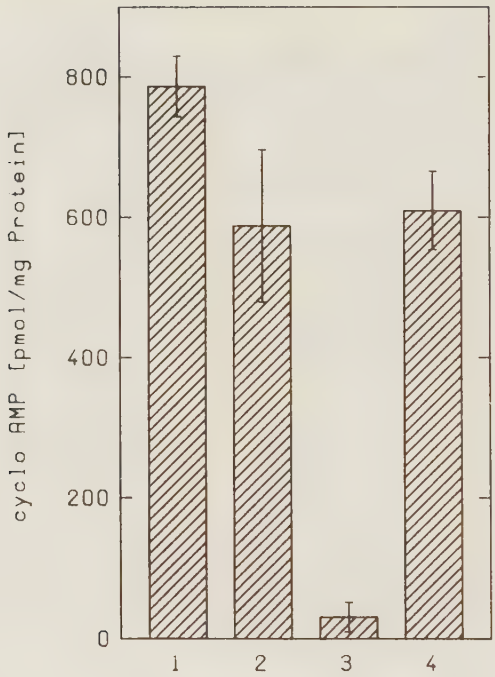


Abb. 41: Einfluß von Waschvorgängen auf den Hemmeffekt von proteingebundenem Diabolin.

Diabolinpräparat: reaktiviertes Methanoleluat der Kieselgelsäule (Kap. 3.5.1.2.)

Säule	Diabolin	Waschung
1	-	-
2	-	2 x
3	4 %(v/v)	-
4	4 %(v/v)	2 x

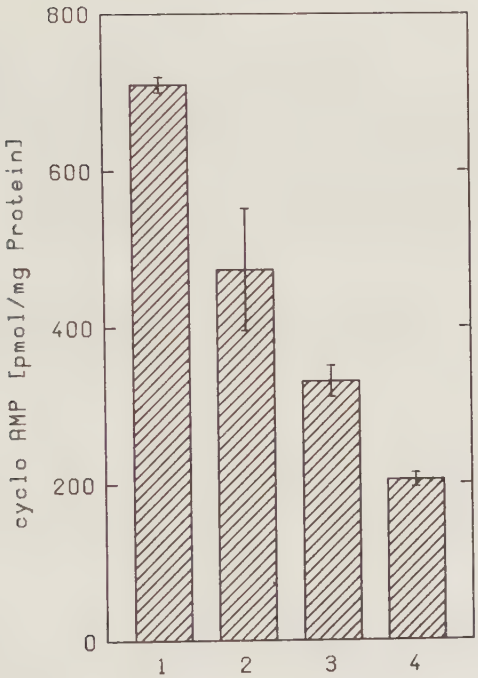


Abb. 42: Einfluß von Waschvorgängen auf den Hemmeffekt von proteinfreiem Diabolin.

Diabolinpräparat: Methanoleluat der Kieselgelsäule (Kap. 3.5.1.2.) in PBS

Säule	Diabolin 4 %(v/v)	Waschvorgänge	fap-HSA im Waschpuffer
1	-	2 x	-
2	+	-	
3	+	2 x	-
4	+	2 x	1 %(w/v)

Die verstärkte Hemmung nach zweimaligem Waschen (vgl. Säule 2 gegenüber Säule 3) ist unerklärt, könnte aber auf unerwarteten Zellverlust beim mehrfachen Waschen zurückzuführen sein.

in Hepes-Puffer inkubiert und, wo angegeben, zweimal mit inhibitorfreiem Puffer gewaschen (Dauer beider Waschvorgänge zusammen zwischen 15 und 20 s). Die sich anschließende 10 min Hauptinkubation wird durch Zugabe von hormonhaltigem Inkubationsmedium, bzw. in den Fällen ohne Waschung durch Zusatz von Hormon direkt zum Medium, gestartet.

Unter diesen Versuchsbedingungen ist der Hemmeffekt von Diabolin vollständig und sofort reversibel (Abb.41) (Wagner et al., 1981).

Der in jedem Versuch zu beobachtende Verlust an Gesamtaktivität durch das Waschen ist auf die Ablösung von Zellen und wahrscheinlich auch auf unvermeidbare Temperaturschwankungen während der Waschvorgänge zurückzuführen.

Um den Einfluß des reaktivierenden Proteins (fap-HSA) auf die Reversibilität zu untersuchen, werden die Experimente mit proteinfreiem Diabolin wiederholt (Abb.42).

Die mit nicht-reaktiviertem Diabolin erzielbare Hemmung ist, wie erwartet (Kap. 3.2.2.1.), wesentlich geringer (Abb.42). Die Hemmwirkung des proteinfreien Faktors ist jedoch unter den gleichen Versuchsbedingungen wie in Abb.41 nicht oder zumindest nicht schnell genug (20 s) reversibel (Abb.42). Im Gegenteil, setzt man dem Waschpuffer reaktivierendes Protein zu [fap-HSA, 1 %(w/v)], wird die Hemmwirkung sogar noch verstärkt (Abb.42). Diese nachträglich erzeugte Hemmung ist jedoch wesentlich geringer als die mit à priori reaktiviertem Faktor erzielbare (vgl. Abb.41 und 42).

Die denkbare Möglichkeit, daß noch im Medium befindliches "überschüssiges" Diabolin nachträglich an zuge-

setztes Protein bindet und dadurch reaktiviert wird, scheidet als Ursache für den zusätzlichen Hemmeffekt aus, da die Hemmwirkung von proteingebundenem Diabolin ja vollständig reversibel ist (Abb.41).

Um die Hypothese zu erhärten, daß bereits an die Zellen gebundenes Diabolin nachträglich durch Protein reaktivierbar ist, sind Untersuchungen zur Kinetik der Reaktivierung von Diabolin im Sekundenbereich unerläßlich. Das bisher unverzichtbare biologische Testsystem erweist sich jedoch als zu insensitiv, um derartige Kinetiken aufzulösen (Daten nicht gezeigt).

Ein Protein von der Größe des Serumalbumins ist nicht in der Lage, innerhalb von 20 s das Cytosol einer Zelle selektiv und quantitativ zu verlassen, lediglich getrieben durch ein Konzentrationsgefälle. Man muß daher schließen, daß reaktiviertes Diabolin seine Hemmwirkung direkt in oder an der Plasmamembran ausübt (Clark et al., 1980). Die vollständige Reversibilität der Hemmwirkung proteingebundenen Diabolins beweist außerdem, daß der Serumfaktor unmittelbar als Inhibitor wirkt und nicht durch Wegfangen eines potentiellen, extrazellulär zugänglichen Aktivators (White & Karr, 1980). Die beschriebenen Versuche zur Reversibilität widerlegen auch die Vermutung, daß Diabolin intrazellulär einen Aktivator des Cyclasesystems (Pecker & Hanoune, 1977a und 1977b; Moss & Vaughan, 1978) kompetitiv von seinem Akzeptor verdrängt.

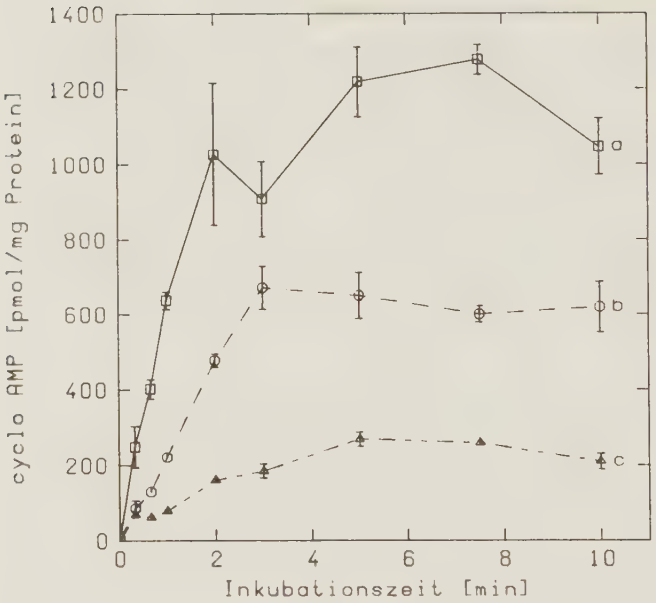


Abb. 43: Kinetik der L-Noradrenalin stimulierten cyclo AMP-Akkumulation in An- und Abwesenheit von Diabolin (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.4.1.).

Diabolinpräparat: Acetonpulver (Kaninchenserum) in PBS (Seq)

Kurve a: Kontrolle: Zusatz von PBS [2 %(v/v)]

Kurve b: Zusatz von Diabolin [0.02 %(v/v)]

Kurve c: Zusatz von Diabolin [2 %(v/v)]

3.9.5. Zeitverlauf des Hemmeffektes

Die Untersuchung des Zeitverlaufs der Wirkung eines exogenen Faktors läßt Rückschlüsse auf seinen möglichen Wirkort zu und liefert damit Hinweise auf eventuelle metabolische Veränderung dieses Faktors. Im Falle eines Inhibitors können durch Variation des Zugabezeitpunktes nach Stimulationsbeginn zusätzlich Erkenntnisse über den Mechanismus der Hemmwirkung gewonnen werden.

Um diese Fragen zu klären, werden Gliomazellen zu verschiedenen Zeiten nach Hormonzusatz mit Diabolin (gelöstes Acetonpulver) konfrontiert (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.4.1.). In den Fällen, in denen Diabolin und stimulierendes Hormon dem Inkubationsansatz gleichzeitig zugesetzt werden, hängt die Höhe des erreichbaren intrazellulären cyclo AMP-Spiegels von der Konzentration des Diabolins im Inkubationsmedium ab (Abb.43) (Wagner et al., 1981).

In Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Diabolin stellt sich das Fließgleichgewicht zwischen Auf- und Abbau von cyclo AMP auf unterschiedlichen Niveaux ein (Abb.43). Die Hemmung des cyclo AMP-Anstiegs ist nach spätestens 20 s eindeutig nachweisbar (Abb.43). Ein qualitativ gleicher Verlauf der Meßdaten ergibt sich, wenn dieses Experiment in Gegenwart des Phsophodiesterase-Hemmers ZK 62 711 (Endkonzentration: 0.2 mmol/l) durchgeführt wird, mit der Einschränkung, daß innerhalb der 10 min Inkubationsdauer kein Plateau erreicht wird (Daten nicht gezeigt).

Man muß daraus folgern, daß Diabolin in der Lage ist, die hormonelle Stimulation der Adenylatcyclase augenblicklich und effektiv zu unterdrücken.

Um nun zu klären, ob Diabolin auch eine stimulierte, bereits hoch aktive Cyclase hemmend zu beeinflussen vermag, wird der Inhibitor erst 2 min nach Stimulationsbeginn zugesetzt (Abb.44).

Auch unter diesen Bedingungen hemmt Diabolin die cyclo AMP-Synthese ohne erkennbare (unter 15 s) Verzögerung und mit hoher Effektivität (Abb.44). Das Ausmaß dieser Hemmung ist wiederum abhängig von der Konzentration an Diabolin im Inkubationsmedium (Abb. 44). Der insgesamt gemessene Abfall des cyclo AMP--Spiegels nach Diabolinzusatz ist auf die Aktivität der Phosphodiesterase zurückzuführen. Dieser Abfall unterbleibt, wenn das Experiment in Anwesenheit eines Phosphodiesterase-Blockers durchgeführt wird (Daten nicht gezeigt). Es ist offensichtlich, daß Diabolin auch ein bereits hormonell stimuliertes Cyclasesystem effizient zu hemmen vermag.

Bei den beobachteten Kinetiken sowohl der Diabolinwirkung als auch seiner Reversibilität kommt nur die Plasmamembran selbst als Angriffspunkt für Diabolin in Betracht. Die naheliegendste Einflußnahme auf eine biologische Membran besteht in einer Änderung der Mikroviskosität und damit verbunden einer Veränderung sowohl der Lateraldiffusion integraler Membranbestandteile (Kirata et al., 1979) als auch gegebenenfalls der enzymatischen Aktivität solcher Proteine (Henis et al., 1982). Die Beeinflussung der Membranfluidität

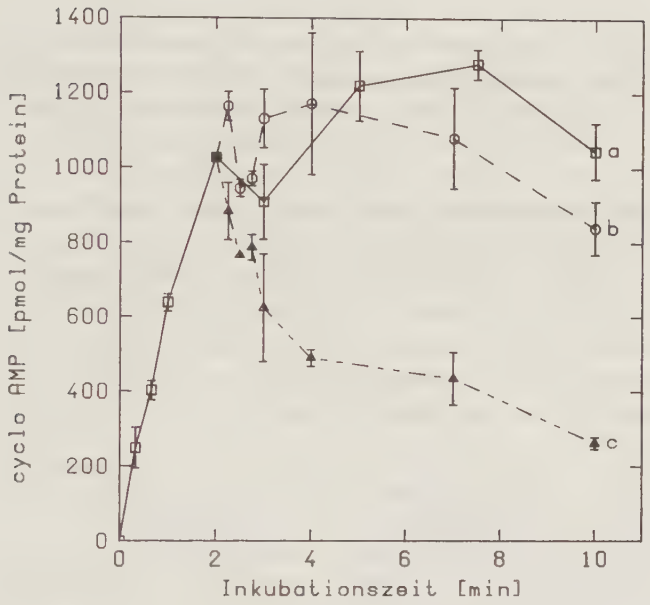


Abb. 44: Kinetik der Hemmwirkung als Folge des Diabolin-zusatzes 2 min nach Stimulationsbeginn (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.4.1.).

Diabolinpräparat: Acetonpulver (Kaninchen-serum) in PBS (Seq)

Kurve a: Kontrolle: Zusatz von PBS [2 %(v/v)]

Kurve b: Zusatz von Diabolin [0.02 %(v/v)]

Kurve c: Zusatz von Diabolin [2 %(v/v)]

durch einen exogenen Faktor, z.B. durch die bloße Insertion eines lipophilen Agens (Zwiller et al., 1976; Clark et al., 1980), wäre stark temperaturabhängig (Renooij & van Golde, 1976). Da aber Warmblüterzellen ihren Stoffwechsel und insbesondere alle erregbaren Funktionen, nur in einem sehr engen Temperaturintervall voll aufrecht erhalten können (Zick et al., 1982), versprechen Untersuchungen zu Temperatureffekten an ganzen Zellen wenig Erfolg. Es stehen allerdings heute moderne Methoden zur Verfügung, die Membranfluidität von Zellen mit hohem apparativen Aufwand in situ zu quantifizieren (Galla & Sackmann, 1974).

Die Vorstellung, daß ein, z.B. einem Phospholipid ähnliches, Molekül durch einfache Insertion in die Plasmamembran die beobachtete Hemmung hervorrufen könnte (Rethy et al., 1972), läßt sich nur schwer mit den kinetischen Daten zur Reversibilität des Hemmeffektes vereinbaren (Kap. 3.9.4.).

3.9.6. Hemmeffekt auf Homogenate und Membranen

Es wäre denkbar, daß Diabolin durch seine Bindung an die Plasmamembran die intrazelluläre Konzentration eines Aktivators (Pecker & Hanoune, 1977a und 1977b; Rasenick & Bitensky, 1980) oder Inhibitors des Adenylatcyclase-Systems beeinflußt. Um diese Vermutung auszuschließen, wird der Einfluß von Diabolin auf die Stimulierbarkeit von Zellhomogenaten und -membranen untersucht. Diabolin hemmt konzentrationsabhängig die hormonelle Stimulierbarkeit in Zellhomogenaten aus

Gliomazellen C6-BU-1 (Tab.20). Deshalb ist es wenig wahrscheinlich, daß ein intrazellulärer Effektor am Wirkungsmechanismus von Diabolin beteiligt ist.

Tab. 20: Einfluß proteingebundenen Diabolins auf die hormonelle Stimulierbarkeit von Zellhomogenaten aus Gliomazellen (experimentelle Einzelheiten unter 7.4.4.3.).
Eine Basisaktivität von 423 pmol cyclo AMP · (mg Protein)$^{-1}$ · (10 min)$^{-1}$ ist von allen Werten subtrahiert worden.

Diabolinpräparat: Acetonpulver in H_2O (Seq)

Serum-äquivalente [%(v/v)]	L-Isoproterenol [10 mmol/l]	spezifische Aktivität der Adenylatcyclase [pmol cyclo AMP_1 · (mg Protein)$^{-1}$ · (10 min)$^{-1}$]	Hemmung [%]
0	+	438 ± 33	=0
0.04	+	479 ± 74	-9 ± 17
0.4	+	274 ± 46	37 ± 11
4	+	88 ± 54	80 ± 12

Die Sensitivität der Homogenate gegenüber Diabolin ist jedoch um ein bis zwei Größenordnungen geringer als diejenige intakter Zellen. Gleiches gilt für isolierte Membranen aus Chang-Leberzellen (Daten nicht gezeigt). Noch ungünstiger liegt die Sensitivität bei Homogenaten aus Ratten-Glioma x Mäuse-Neuroblastoma-Hybridzellen (Propst, 1980).

Es ist bekannt, daß sich die introvertierte Teilschicht einer biologischen Membran-Doppelschicht in seiner

Phospholipidzusammensetzung von der nach außen gewandten Schicht unterscheidet (Gordensky & Marinetti, 1973; Fontaine et al., 1979 und 1980). Es besteht somit ein komplexer Konzentrationsgradient dieser Moleküle über die Membran. Nimmt man nun an, daß Diabolin bei intakten Zellen nur auf die äußere Teilschicht der Plasmamembran einwirkt, so hätte das einen Einfluß auf diesen Gradienten. Eine Änderung dieses Gradienten könnte sich hemmend auf die enzymatischen Aktivitäten der Membranproteine auswirken (Bakardijeva et al., 1979; Frenkel et al., 1980). Diese Annahme erklärt möglicherweise die geringere Sensitivität der Membranhomogenate (Tab.20), da unter invasiven Bedingungen der Inhibitor theoretisch zu beiden Teilen der Membrandoppelschicht gleich gut Zugang hätte.

Die lipoiden Komponenten der äußeren Teilschicht einer biologischen Membran stehen im Gleichgewicht mit dem umgebenden Medium (Nelson, 1967). Die Zusammensetzung dieser Schicht und damit der entsprechende Gradient der Membran hängt somit vom Serumgehalt des Kulturmediums ab. Es ist deshalb zu erwarten, daß zur effektiven Beeinflussung dieses Membrangradienten möglicherweise weniger Moleküle erforderlich sind, wenn die Membran zuvor mit serumfreiem Medium äquilibriert worden ist, was ja auch beobachtet wird (Kap. 3.1.3.1.).

Die technischen Vorteile einer Membranpräparation bzw. eines Zellhomogenates als Routinetestsystem im Vergleich zu lebenden Zellen, insbesondere was Reproduzierbarkeit, Handhabbarkeit, Flexibilität und Kontaminationsgefährdung anlangt, sind so überzeugend, daß künftige Arbeiten keine Mühen scheuen sollten, die Sensitivität dieses Testsystems zu erhöhen.

3.9.7. Zusammenfassung

1. Diabolin wirkt direkt hemmend auf die Neusynthese von intrazellulärem cyclo AMP. Die Hemmung ist unabhängig von der Aktivität der Phosphodiesterase.

2. Diabolin unterdrückt auch die Basisaktivität der Adenylatcyclase.

3. Mit Choleratoxin stimulierte Gliomazellen werden durch Diabolin nur nach langer Verzögerungsphase hemmend beeinflußt.

4. Der Hemmeffekt proteingebundenen Diabolins ist innerhalb von 20 s vollständig reversibel. Der wesentlich schwächere Hemmeffekt proteinfreien Diabolins wird durch Zusatz von Serumalbumin verstärkt und ist innerhalb von 20 s nicht reversibel.

5. Diabolin wirkt im Sekundenbereich. Es vermag nicht nur die Stimulation der Zellen zu unterbinden, sondern hemmt auch das bereits stimulierte Adenylatcyclasesystem höchst effektiv.

6. Diabolin ist in der Lage, die hormonelle Stimulation von Zellhomogenaten bzw. isolierten Membranen zu hemmen, wenn auch mit wesentlich niedrigerer Sensitivität als in ganzen Zellen.

3.10. Hypothetische Kanditaten

Zur Abkürzung induktiver Problemlösungen, insbesondere iterativer Art, stehen in der Mathematik verschiedene deduktive Methoden zur Verfügung. Die Monte-Carlo-Methode führt in aller Regel in einem Bruchteil der bei induktiven Verfahren benötigten Zeit zur gewünschten Lösung.

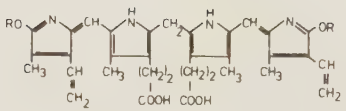
Parallel zu den Versuchen zur Isolierung und Charakterisierung von Diabolin wurde deshalb eine Reihe von Substanzen bezüglich ihrer Hemmaktivität auf das ß-adrenerg stimulierte Adenylatcyclase-System untersucht. Dies geschah in der Annahme, Diabolin könne mit der jeweils untersuchten Substanz identisch sein. Die Auswahl der getesteten Verbindungen lag zum jeweiligen Zeitpunkt aufgrund entsprechender biochemischer Befunde nahe.

Bereits früher wurde gezeigt, daß weder 2':3'-cyclisches Adenosinmonophosphat, noch eine Cholesterolfraktion (Steroide) aus Serum als die gesuchte Serumaktivität in Frage kommen (Wagner, 1978).

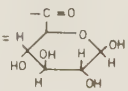
3.10.1. Phosphatidsäure

Phosphatidsäure (Abb. 45, Formel 3) hemmt das ß-adrenerg stimulierte Adenylatcyclase-System (Clark et al., 1980; Schimmel et al., 1980). Diese Hemmung ist derjenigen von Diabolin vergleichbar, wenn eine Lösung von

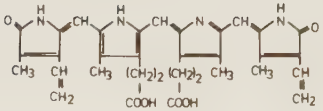
(1) Bilirubin



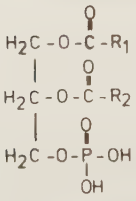
(1a) R = H Bilirubin

(1b) R =  : Bilirubin - diglucuronid

(2) Biliverdin



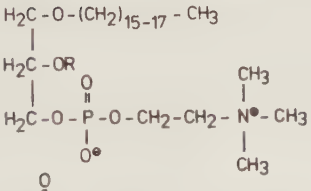
(3) Phosphatidsäure



R_1, R_2 = unverzweigte, langkettige aliphatische Reste

Abb. 45: Formelübersicht

(4) Thrombocyten-aktivierender Faktor

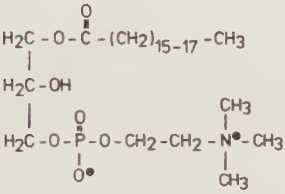


(4a) R = $-C(=O)-CH_3$: PAF

(4b) R = H : Lyso-PAF

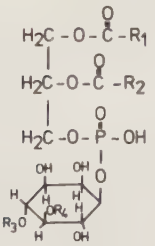
---

(5) Lysolecithin



---

(6) Phosphatidylinositol (phosphate)



R_1, R_2 = unverzweigte, langkettige aliphatische Reste

(6a) $R_3 = R_4 = H$: Phosphatidylinositol

(6b) $R_3 = -PO_3H, R_4 = H$: Phosphatidylinositol-4-phosphat

(6c) $R_3 = R_4 = -PO_3H$: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

Abb. 45: Formelübersicht

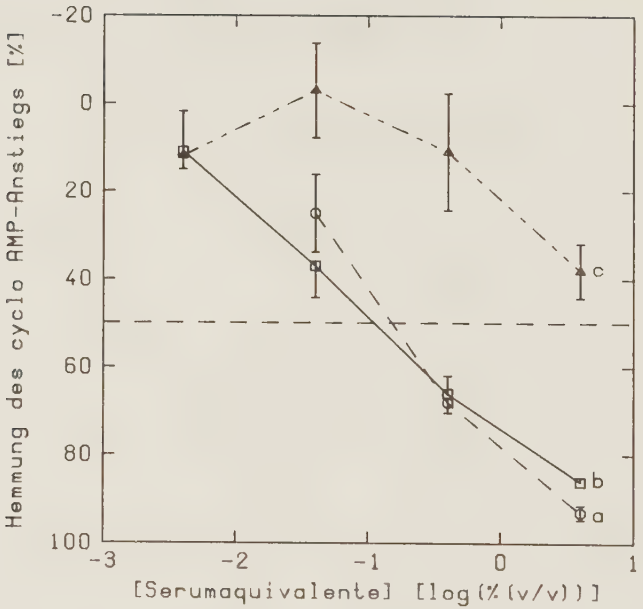


Abb. 46: Untersuchung von Phosphatidsäure auf Hemmwirkung an Gliomazellen.
Ein Milliliter Phosphatidsäure-Lösung (250 µmol/l) wird willkürlich einem Milliliter Serum äquivalent gesetzt.

Kurve a: Phosphatidsäure (250 µmol/l)

Kurve b: Kontrolle: Acetonpulver in PBS (Seq)

Kurve c: Phosphatidsäure (250 µmol/l) +
+ 3 %(w/v) IgG + 5 %(w/v) HSA

0.25 mmol/l Phosphatidsäure in PBS als Serumäquivalent verwandt wird (Abb.46). Wird diese Lösung jedoch vorher mit fap-HSA [5 %(w/v)] und Immunglobulin G [3 %(w/v)] inkubiert (experimentelle Einzelheiten unter 7.3.3.), so wird nur noch ein Bruchteil der Hemmaktivität gefunden (Abb.46).

Phosphatidsäure kann deshalb mit Diabolin nicht identisch sein.

3.10.2. Bilirubin

Bilirubin kommt im Serum in zwei Formen vor, in einer diglucuronierten, wasserlöslichen ("direktes Bilirubin"; Abb.45, Formel 1b) und in einer nativen, fest an Serumalbumin gebundenen Form ("indirektes Bilirubin"; Abb.45, Formel 1a). Die wasserunlösliche, proteingebundene Form kann die Blut-Hirn-Schranke durchdringen (Odell et al., 1969) und lagert sich dort in bestimmten Regionen des Gehirns in lipidreichen Schichten ein.

Erhöhte Mengen von Bilirubin im Gehirn führen über einen bis heute unbekannten Mechanismus zu schwersten Schädigungen ("Kernikterus") (Virchow, 1847; Schutta & Johnson, 1967).

Weder Bilirubin noch sein Vorläufermolekül Biliverdin (Abb.45, Formel 2) zeigen, weder allein noch in proteingebundener Form, zwischen nmol/l und 30 µmol/l einen hemmenden Effekt auf die hormonell stimulierte cyclo AMP-Bildung in Gliomazellen C6-BU-1 (Daten nicht gezeigt). Diabolin ist nicht mit Bilirubin oder Biliverdin identisch.

3.10.3. Thrombocyten-aktivierender Faktor

1979 wurde über die Synthese eines bisher unbekannten, biologisch aktiven Phospholipids berichtet (Demopoulos et al., 1979; Benveniste et al., 1979), dessen Identität mit PAF (platelet activating factor) heute als gesichert gelten kann (Hanahan et al., 1980). Ein Beweis ist wegen zu geringer verfügbarer Mengen nicht möglich (Chignard et al., 1979). Dieser Faktor ist im Plasma bereits in einem Konzentrationsbereich von pmol/l halbmaximal wirksam (Cusack, 1980).

1979 stellte sich heraus, daß dieses Lipid, ein 1-O--alkyl-2-acetylglyceryl-3-phosphorylcholine (Abb.45, Formel 4a), identisch ist mit einem den Blutdruck senkenden, natürlich vorkommenden Agens APRL (antihypertensives polares renomedulläres Lipid) (Blank et al., 1979).

PAF und seine 2-Lysoform (Abb.45, Formel 4b) wurden in einem Konzentrationsbereich von fmol/l bis 400 µmol/l auf ihre Hemmaktivität geprüft. Beide kommerziell erhältlichen, synthetischen Verbindungen zeigen bis zu einer Endkonzentration von 40 µmol/l keine Hemmwirkung auf hormonell stimulierte Gliomazellen, weder in freier, noch in albumingebundener Form (Abb.47).

Bei der extrem hohen Konzentration von 400 µmol/l wird eine Hemmung beobachtet (Abb.47), die aber im Gegensatz zu Diabolin durch Zusatz von fap-HSA nicht verstärkt, sondern aufgehoben wird. Dieser Befund wird als unspezifischer Lipideffekt interpretiert (vgl. Kap. 3.10.1.). Diabolin ist also von PAF und seiner 2-Lysoform verschieden.

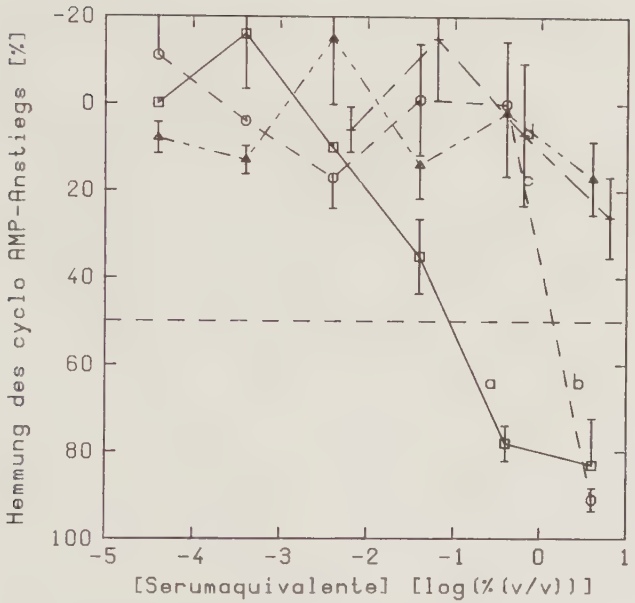


Abb. 47: Untersuchung von PAF auf Hemmwirkung an Gliomazellen.
Ein Milliliter PAF-Lösung (1 mg/ml) wird willkürlich einem Milliliter Serum äquivalent gesetzt.

Diabolinpräparat: Acetonpulver in PBS (Seq)

Kurve a: Kontrolle: Diabolin

Kurve b: PAF (1 mg/ml)

Kurve c: Kontrolle: fap-HSA

Kurve d: PAF (1 mg/ml) + fap-HSA

Unter 400 pmol/l PAF liegen die Daten ausnahmslos um 0 % Hemmung und werden deshalb nicht gezeigt.

3.10.3.1. Diskussion

Nahezu alle bis heute über Diabolin erhobenen biochemischen Befunde sind mit der Struktur von PAF (Abb.45, Formel 4a) widerspruchslos zu vereinbaren.

PAF ist ein Kleinmolekül, das sowohl einen lipophilen als auch einen hydrophilen Teil aufweist. PAF besitzt keine freie Aminogruppe, reagiert deshalb auch nicht mit Dansylchlorid. PAF wird durch Behandlung mit Phospholipase C in zwei Bruchstücke unterschiedlicher Polarität gespalten (Benveniste et al., 1977). PAF wird durch Methanolyse im Alkalischen zerstört (Benveniste, 1974). PAF ist nur in Gegenwart von 0.25 %(w/v) Serumalbumin aus Leukocyten bzw. Thrombocyten isolierbar (Benveniste, 1980). Aus dieser Bindung an Protein wird PAF durch Methanolelution gelöst (Tencé et al., 1980). Eintrocknung von PAF in Glasgefäßen führt zu erheblichen Ausbeuteverlusten, was durch die Anwesenheit von Albumin verhindert wird. PAF bindet unspezifisch an DEAE- und CM-Cellulosen und ist von dort mit herkömmlichen Methoden nicht eluierbar, wohl aber mit einer 0.25 %(w/v) Serumalbuminlösung (Benveniste, 1974). Bei der Auftrennung von PAF auf Kieselgel-TLC-Platten geht Aktivität verloren, als Folge der an SiO_2 katalysierten Hydrolyse der 2-Acetylgruppe (Benveniste et al., 1977). Reacetylierung an Position 2 restauriert die volle biologische Aktivität.

Als Phospholipid sollte PAF problemlos in eine Plasmamembran inserieren und dort zu Veränderungen der Membranfluidität führen. PAF ist hochpotent und wirkt in Konzentrationsbereichen, die normalerweise Hormonen vorbehalten sind (Cusack, 1980).

PAF sollte dagegen durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase nicht zu beeinträchtigen sein, da es keine Phosphorsäure-Monoesterbindung enthält.

Nach all der frappierenden Kongruenz der Eigenschaften von PAF einerseits und dem gesuchten Diabolin andererseits, ist es vernünftig, in Diabolin ein ähnlich strukturiertes Molekül zu vermuten. Ein wesentlicher Unterschied muß allerdings zwischen beiden Verbindungen bestehen, der entscheidende Teil nämlich, der die biologische Wirkung von Diabolin ausmacht.

Noch eine weitere Gemeinsamkeit könnten PAF und Diabolin aufweisen. PAF kommt in so geringen Mengen im Blut vor, daß eine Isolierung und Identifizierung trotz jahrelanger Bemühungen mehrerer Arbeitsgruppen nicht möglich ist. Nachdem 1972 eine Isolierung von PAF aus 150 l Blut mißlang (Benveniste et al., 1972) und 1979 auch ein Großansatz mit 1800 l Blut keinen Erfolg brachte (Chignard et al., 1979), wurde bis heute (1982) über keine weiteren Isolierungsversuche mehr berichtet.

3.10.4. Sonstige

Weder Lysolecithin (Abb.45, Formel 5) (Shier et al., 1976; Zwiller et al., 1976) noch Phosphatidylinositol (Abb.45, Formel 6a) oder eines der beiden Phosphatidylinositolphosphate (Abb.45, Formeln 6b und 6c) zeigen nennenswerte oder gar durch Protein reaktivierbare Hemmaktivitäten (Abb.48).

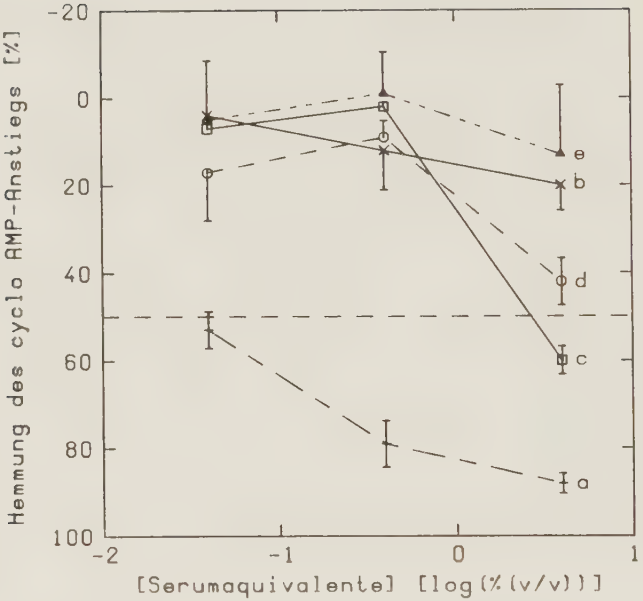


Abb. 48: Untersuchung von Phosphatidylinositol und seines Mono- und Bisphosphates auf Hemmwirkung an Gliomazellen.
Ein Milliliter Inositol-Lösung (0.5 mg/ml) wird willkürlich einem Milliliter Serum äquivalent gesetzt.

Kurve a: Kontrolle: Acetonpulver in PBS (Seq)

Kurve b: Kontrolle: Diabolin

Kurve c: Phosphatidylinositol (0.5 mg/ml) + + fap-HSA

Kurve d: Phosphatidylinositol-4-monophosphat (0.5 mg/ml) + fap-HSA

Kurve e: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (0.5 mg/ml) + fap-HSA

3.10.5. Zusammenfassung

Von den als Diabolinkandidaten in Betracht gezogenen Substanzen bekannter Struktur (Phosphatidsäure, Lysolecithin, Phosphatidylinositol und seine Mono- und Bisphosphorsäureester, PAF, Lyso-PAF, Bilirubin, Biliverdin) wurde keine gefunden, deren biologisches und chemisches Verhalten dem des Diabolins entspricht.

4. Z U S A M M E N F A S S U N G

Mit Hilfe eines biologischen Testsystems an einer permanenten Zellinie des Nervensystems wird Diabolin aus Humanserum angereichert und charakterisiert, ein Faktor mit teilweise ungewöhnlichen biochemischen Eigenschaften, der die hormonell stimulierbare intrazelluläre Anhäufung des 3':5'-cyclischen Adenosinmonophosphates (cyclo AMP) hochpotent unterdrückt.

1. Diabolin kommt in allen bisher untersuchten Säugetierseren in vergleichbarer Aktivität vor. Das Blutplasma von Vögeln enthält deutlich weniger Hemmfaktor. Eine entsprechende Hemmaktivität wird auch in Lymphe gefunden, nicht aber in Speichel, Milch, Urin oder Cerebrospinalflüssigkeit.

2. Die Hemmwirkung von Diabolin ist unabhängig vom untersuchten Zelltyp und vom eingesetzten Agonisten. Die Sensitivität ist jedoch mindestens im Falle der Gliomazellen C6-BU-1 negativ abhängig von der Dichte der Testzellen.

3. Diabolin ist kein Protein.

4. Diabolin bindet unspezifisch an Proteine unterschiedlicher Größe und Herkunft und täuscht dadurch deren Proteineigenschaften vor.

5. Proteinfreies Diabolin ist biologisch wenig aktiv und verhält sich in vieler Hinsicht wie ein Lipid.

6. Diabolin läßt sich durch Methanolelution von seinem Trägerprotein lösen und durch hydrophobe Chromatografie in mehrere Gipfel auftrennen, die zumindest teilweise ineinander überführbar sind.

7. Die Aktivität von Diabolin wird durch Behandlung mit Proteasen nicht beeinträchtigt, wohl aber durch Um-/Veresterung im Alkalischen, sowie durch Behandlung mit Phospholipase C oder Phosphatasen.

8. Diabolin enthält keinen für die Aktivität notwendigen und mit Periodat oxidierbaren Zucker mit cis--Diol-Konfiguration oder cis-Amino-hydroxy--Gruppierung.

9. Diabolin besitzt keine für die Aktivität notwendige und für Dansylchlorid zugängliche freie Aminogruppe.

10. Proteinfreies Diabolin adsorbiert, im Gegensatz zur proteingebundenen Form, unspezifisch sowohl an geladene als auch an neutrale Cellulosen, außerdem an Kieselgel und andere gängige Chromatografiematerialien.

11. Proteingebundenes Diabolin bindet abhängig von Temperatur und Hydroniumionenkonzentration an Aktivkohle.

12. Die Hemmwirkung von proteingebundenem Diabolin auf die de-novo-Synthese von cyclo AMP ist bereits im Sekundenbereich nachweisbar und vollständig reversibel.

13. Diabolin ist nicht identisch mit Phosphatidsäure, Bilirubin, Biliverdin, Lysolecithin oder einem der Phosphatidylinositolphosphate.

14. Diabolin ist ferner nicht identisch mit dem Thrombocyten-aktivierenden Faktor (PAF, 1-0-Alkyl-2--acetylglyceryl-3-phosphorylcholin) bzw. dem antihypertensiven polaren renomedullären Lipid (APRL).

5. D I S K U S S I O N

Bei jedem Naturstoff, der durch ungewöhnliche physiologische Wirkungen unsere Aufmerksamkeit erweckt, konzentriert sich das Interesse zu allererst auf die Erkenntnis von Struktur und Wirkungsmechanismus. Davor aber steht das Problem seiner Isolierung, Identifizierung und unabhängigen Synthese.

In der vorliegenden Studie wurde die wesentliche Vorarbeit zur Isolierung eines solchen Naturstoffes, des Diabolins, geleistet sowie eine Eingrenzung seiner chemischen wie biochemischen Eigenschaften begonnen. Letzteres geschah allerdings an der noch unreinen Substanz, in der Hoffnung, dadurch weitere Hinweise für seine Reindarstellung zu gewinnen.

Diabolin ist mit Sicherheit kein Protein/Peptid (Protease- und BrCN-Resistenz) und wahrscheinlich auch keine Nucleinsäure (RNAase- und DNAase-Resistenz). Diabolin bindet (unspezifisch?) an Proteine und wird dadurch biologisch aktiv. Durch diese Bindung nimmt Diabolin scheinbar Eigenschaften seines jeweiligen Trägerproteins an. Dies erklärt die Widersprüche, in denen die publizierten Berichte untereinander und zu vorliegender Arbeit stehen.

Diabolin ist lipophil (sehr feste Bindung an Serumalbumin und andere Proteine) und zugleich hydrophil (Elution aus Serum-Acetonpulver mit Methanol, dagegen nicht mit Propanol). Diabolin ist polarer als Zucker, da es sich aus einer Kieselgelsäule mit Methanol (wie Phospholipide), nicht aber mit Aceton (wie Glykolipide) eluieren läßt. Es scheint sich also um ein amphipathes

Molekül zu handeln, wiederum wie ein Phospholipid.

Die Sensititivität der Diabolinaktivität gegenüber Alkalischer Phosphatase, Phospholipase C und Neuraminidase deutet in verwirrender Weise auf das gleichzeitige Vorliegen sowohl von Phosphorsäuremonoester-, speziellen Phosphosäurediestergruppen als auch Glykolipidseitenketten hin. Hier zeichnen sich die Grenzen ab, eine noch unreine Substanz strukturell zu charakterisieren. Die scheinbaren Widersprüche können erst durch Untersuchungen an hochreinem Diabolin aufgeklärt werden.

Die Tatsache, daß die biologische Aktivität von Diabolin bei der hydrophoben Chromatografie an verschiedenen Stellen im Elutionsgipfel gefunden wird und die Aktivitätsgipfel teilweise ineinander überführt werden können, läßt befürchten, daß auch mögliche Abbauprodukte und/oder Assoziate biologische Hemmwirkung auf das Adenylatcyclase-System aufweisen können. Wäre das der Fall, stünden einer Reinigung des Diabolins zusätzliche große Hindernisse im Weg.

Die unspezifische Adsorption von Diabolin an sehr viele Materialien deutet genauso wie die unterhalb der Nachweisgrenzen liegende Phosphat- und Zuckermenge in biologisch aktiven Diabolinfraktionen (nach Auftrennung an Sephadex LH 20) darauf hin, daß Diabolin wahrscheinlich in extrem niedriger Konzentration im Serum vorkommt. Diese und eine Reihe weiterer Eigenschaften, die Diabolin mit PAF teilt, würden seine Isolierung verhindern.

Vor allem die Inaktivität von PAF im Diabolin-Testsystem schließt eine Identität beider aus. Dieser Be-

fund allerdings muß noch weiter untermauert werden. PAF ist erst seit wenigen Wochen kommerziell zu erhalten. Das in vorliegender Arbeit verwandte PAF--Präparat ist noch in keiner unabhängigen positiven Kontrolle als aktives PAF ausgewiesen.

Klarere Auskünfte als zur chemischen Natur lassen sich über die Wirkungsweise, genauer über den (einzigen?) Wirkungsort von Diabolin geben. Es greift jenseits der Hormonrezeptoren hemmend ins Adenylatcyclase-System ein, möglicherweise auf der Ebene des G/F-Proteins. Es ist aber weder bekannt, wie das geschieht, noch ob das Adenylatcyclase-System der einzige betroffene Angriffspunkt ist. Sehr wichtig wäre zu erfahren, ob die hormonell regulierte Guanylatcyclase und/oder andere Membranenzyme (z.B. Transportsysteme, Ionenkanäle) von Diabolin beeinflußt werden. Es ist zu erwarten, daß eine so gravierend in das regulatorische Zellgeschehen eingreifende Substanz wichtige physiologische und pathophysiologische Bedeutung besitzt.

Eine mögliche physiologische Funktion von Diabolin könnte darin bestehen, im Serum als eine Art "Rauschsperre" zu operieren, also zu verhindern, daß im Serum transportierte Hormone bereits in geringsten Konzentrationen wirksam werden.

Gliomazellen reagieren auf Diabolin nach mehrtägigem Serumentzug um Größenordnungen empfindlicher auf Diabolin als Zellen, die in Gegenwart von Serum gezüchtet werden. Neuronen und Gliazellen des Zentralnervensystems kommen unter physiologischen Bedingungen aber nicht mit Serum in Kontakt (Blut-Hirn-Schranke).

Das könnte darauf hinweisen, daß die Zellen des Zentralnervensystems unter in-vivo-Bedingungen gegenüber Diabolin sensibilisiert sind. Andererseits sprechen die Befunde, daß in Cerebrospinalflüssigkeit keine nennenswerten Diabolinaktivitäten gefunden werden, gegen die Vermutung, daß Diabolin selbst ins Gehirn gelangen kann. Es führt in jedem Fall zu katastrophalen pathophysiologischen Konsequenzen, wenn Serum ins Gehirngewebe übertritt, wie sie z.B. bei Gehirnödemen beobachtet werden.

Es wird sich deshalb lohnen, Diabolin zu reinigen, zu identifizieren und seine biologische Bedeutung aufzuklären.

6. A U S B L I C K

Bislang aussichtsreichster Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen zur Isolierung, Charakterisierung und Identifizierung von Diabolin ist sein Verhalten bei der wiederholten hydrophoben Chromatografie (Kap. 3.5.2.3.). Auch das ungewöhnliche Verhalten von Diabolin in Gegenwart von DEAE-Cellulose könnte für seine weitere Isolierung genutzt werden, genauso seine Bindung an Serumalbumin.

Als Hauptkriterien für die weitere Anreicherung von Diabolin müssen dabei gelten

i) Unlöslichkeit des albumingebundenen Diabolins in Aceton,
ii) Löslichkeit von Diabolin in Aceton nach vorheriger Proteasebehandlung mit geringen Enzymmengen,
iii) Reaktivierung der biologischen Aktivität des proteinfreien Diabolins durch Bindung an Proteine,
iv) Sensibilisierung von Gliomazellen gegenüber Diabolin durch zweitägigen Serumentzug und
v) Reversibilität und Zeitverlauf des durch Diabolin hervorgerufenen Hemmeffektes.

Experimente, die die biologische Bedeutung von Diabolin erhellen, versprechen Erfolg vor allem dann, wenn Diabolin in radioaktiver Form zur Verfügung steht.

Eine serienmäßige Analyse verschiedener Proteine und Peptide auf ihre mögliche Träger- und/oder Aktivatorfunktion für Diabolin könnte Hinweise darauf erbringen,

ob für Bindung und/oder Aktivierung von Diabolin z.B. eine Mindestgröße und/oder bestimmte Strukturelemente in den Aminosäureketten erforderlich sind. Im günstigsten Fall gelingt dadurch eine qualitative Trennung beider Funktionen und eröffnet sich somit eine Möglichkeit, den Wirkmechanismus von Diabolin aufzuklären.

Die Behandlung von Diabolin mit hochspezifisch spaltenden Enzymen kann Hinweise auf die Struktur des noch verunreinigten Faktors erbringen und dadurch neue Möglichkeiten zu seiner Reinigung erschließen. Die Erschwernis solcher Untersuchungen durch unspezifische Adsorption von Diabolin an die zugesetzten Proteine könnte durch anschließende Methanolextraktion der Enzyme überwunden werden.

7. EXPERIMENTELLE EINZELHEITEN

7.1. Materialien

7.1.1. Geräte

7.1.1.1. Klammerfreies Membranfiltrationsgerät mit automatischer Filterbelüftung

Zum schnelleren Filtrieren der sehr hohen Probenzahl wurde ein neuartiges Vakuumfiltrationsgerät mit automatischer Filterbelüftung entwickelt (Wagner und Feineis, 1982). Die einfachere Handhabung ermöglicht einen wesentlich erhöhten Probendurchsatz und insbesondere auch die problemlose Verwendung dünner Filtermembranen. Durch den Verzicht auf eine wie auch immer geartete Kaminbefestigungsklammer ist ein Zer- bzw. Einreißen der Filtermembran ausgeschlossen. Dabei ist wesentlich, daß die Filterauflage im geeigneten Zeitpunkt automatisch belüftet wird, ohne Verwendung mechanischer Teile.

Die Funktion der Kaminbefestigungsklammer wird nach dem bloßen Aufsetzen des Kamins von einem Vakuumandruckkanal übernommen, dessen Unterdruck aus derselben Vakuumquelle gespeist wird wie die Filterauflage. Das hat u.a. zur Folge, daß bei abgesetztem Kamin die Filterauflage belüftet ist und die Filtermembran kräftefrei auf ihrer Unterlage liegt (Abb.49).

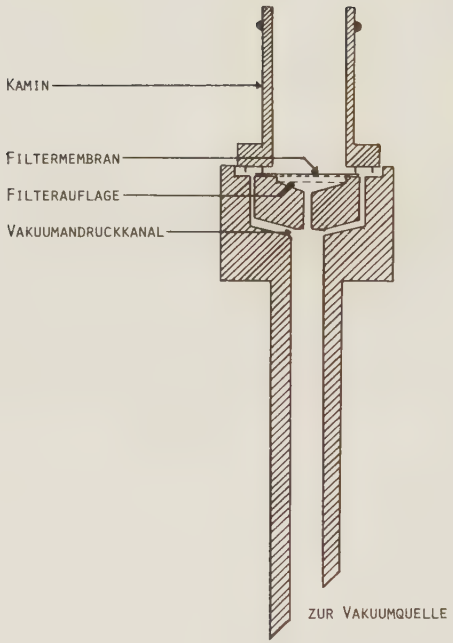


Abb. 49: Klammerfreies Vakuumfiltrationssystem
mit automatischer Filterbelüftung

Mit diesem Gerät sind eine Reihe von Vorteilen erzielbar:

1. Durch den Verzicht auf eine Kaminbefestigungsklammer entfallen je Anwendungszyklus zwei zeitraubende Arbeitsgänge, die zudem aufgrund der ungünstigen Symmetrie der Klammer mit Abstand die beiden konzentrationsaufwendigsten sind.

2. Durch das senkrechte Aufsetzen des Kamins unter Fortfall der seitlich unter Spannung in das Gerät eingeführten Klammer treten zwischen Kamin, Filter und Filterauflage keine Scherkräfte mehr auf, die sehr häufig vor oder nach dem Einfüllen der Flüssigkeit zu Rissen im Filter führen.

3. Durch die besondere Anordnung wird erreicht, daß der Filter ohne Kamin kräftefrei bleibt und somit
   3.1. der Filter nach dem Auflegen nachträglich ohne Probleme zentriert werden kann,
   3.2. vor allem aber beim Abnehmen ein Einreißen des Filters ausgeschlossen ist, was insbesondere bei der üblichen radioanalytischen Aufarbeitung von herausragender Bedeutung ist.

4. Ein bereits aufliegender Filter wird, falls sich der anschließende Arbeitsschritt verzögert, ohne Kamin nicht trockengesaugt.

5. Erhöhte Sicherheit:
   Radioaktive Flüssigkeit, die aufgrund einer Inhomogenität oder Undichtigkeit der Filtermembran

seitlich am Filter austritt, wird durch den Vakuumandruckkanal am weiteren Austritt gehindert und dem Flüssigkeitspool in der Vakuumflasche (Filtratsammlung) zugeführt.

zum Patent angemeldet (Wagner & Feineis, 1981).

7.1.1.2. Sonstige Geräte

BCD-Interface PI 97 A von WIELAND, Wendelstein.

Brutschränke Heraeus Typ B 5060 EK CO_2 von HERAEUS, Hanau und
Forma CO_2-Inkubator von LABOTECT, Göttingen.

Chromatografie-Säulen samt Zubehör:
Eigenbau des MPI für Biochemie, Martinsried.

Fraktionskollektoren 7000 Ultrorac und Ultra Rac III von LKB, Gräfelfing.

Gefriertrockner LO5 von WKF, Modautal.

Gradientenmischer, elektronisch (Gibson) von ABIMED, Düsseldorf und einfaches Mischgefäß: Eigenbau des MPI für Biochemie, Martinsried.

Kühlzentrifuge Sorvall RC-2B und RC-5B mit Rotor SS34 von DU PONT, Bad Nauheim.

Kryostat von COLORA, Lorch.

Leitfähigkeitsmeßgerät PTI-8 digital (Cornig) von BACHOFER, Reutlingen.

Mikroliterpipetten (verstellbar) Pipetman, Transferpetor und Capilettor von ABIMED, Düsseldorf.

Mikrolitherspritzen (Hamilton) von G. SCHMID, Hamburg und (Kloehn) von LATEK, Heidelberg.

Mixer Vortex Genie Mix von BACHOFER, Reutlingen.

Ölpumpen Typ 317 (Drehschieberölpumpe) von DÜRR-DENTAL, Bietigheim und
Trivac (Hochvakuumpumpe) von LEIBOLD-HERAEUS, Köln.

Osmometer Halbmicro Digital von KNAUER, Oberursel.

pH-Meter Modell 3500 von BECKMAN, München und
Knick 643 von BACHOFER, Reutlingen.

Rotationsverdampfer PCR 500 von GENSER, Rothenburg o.T. und Rotavapor-RE 120 von BÜCHI, Flawil (Schweiz).

Schlauchpumpen Varioperpex und Multiperpex von LKB, Gräfelfing.

Sechsfach-Absauganlage für Mehrfach-Gewebekulturplatten: Eigenbau des MPI für Biochemie, Martinsried.

Speed vac Concentrator mit Rotoren Typ 1275 und Typ 4015 von BACHOFER, Reutlingen.

Spektralphotometer PM 6 von ZEISS, Oberkochen.

Sterilisator 270 von AIGNER, Gräfelfing.

Tricarb Liquid Scintillation Spectrometer 3385 und 2660 von PACKARD, Frankfurt.

Tischrechner HP 97 von PACKARD, Frankfurt.

Trockenschrank von MEMMERT, Schwabach.

Ultraschall-Desintegrator (Ultraschallgenerator 250/201 mit Mikrospitze) von KLN, Heppenheim.

UV-Lampe (254 nm und 366 nm) von FLUOTEST, Hanau.

UV-Monitor Isco UA-5 von COLORA, Lorch.

UV-Monitor Uvicord S mit 1- und 2-Kanal-Flachbettschreiber von LKB, Gräfelfing.

Waagen 2001 MP2, 1264 MP und 1205 M von SARTORIUS, Göttingen und M5 von METTLER, Gießen.

Wasserbäder Haake FS 2 und Thermomix 1440 von BRAUN, Melsungen, SB 35 von JAHNKE und KUNKEL, Staufen i.Br. und Iulabo Standard von BENDER und HOBEIN, München.

Wasserreinigungsanlage Nanopure D-1799 (Barnstaed) von WERNER, Köln.

Zentrifugen Rotosilenta K und Tischzentrifuge Mikroliter von HETTICH, Tuttlingen.

Die für die Zellkultur verwandten Geräte sind beschrieben (Traber, 1976).

7.1.2. Sonstige Hilfsmittel

DEAE-Cellulose (DE 52), CM-Cellulose (CM 52), Phospho--Cellulose (P 30), Dextran T 70 von WHATMAN über HERMLE, St. Leon-Rot.

Sephadex G-100-Superfine, Sephadex LH 20, DEAE-Sephadex, DEAE-Sephacel, DEAE-Sepharose Cl-6B, Sephacryl S-200-Superfine, Con A-Sepharose Cl-4B, Blaue Sepharose Cl-6B von PHARMACIA, Freiburg.

Kationenaustauscher AG 50W-X4 (200-400 mesh) und Affigel Blue von BIORAD, München.

Plastikwaren für die Zellkultur von NUNC, Wiesbaden und GREINER,Nürtingen, FALCON PLASTICS und LUX PLASTICS über LS-LABORSERVICE, München.

Mehrfach-Gewebekulturschale (24 Vertiefungen) von COSTAR über GREINER, Nürtingen.

Glasscintillationsfläschchen (Wheaton) von ZINSSER, Frankfurt.

Miniscintillationsfläschchen Pico-vials von PACKARD, Frankfurt.

Dünnschichtplatten Kieselgel Typ 60 F_{254} (0.25 mm) und Kieselgel Typ 60 (2.5 mm), Seesand von MERCK, Darmstadt.

Kieselgel Typ G 60 von MERCK, Darmstadt und
Bio-Sil HA (minus 325 mesh) von BIORAD, München.

Dialyseschlauch Visking von C. ROTH, Karlsruhe.

Glasfilter GF/B und GF/C von WHATMAN über
HERMLE, St. Leon-Rot.

Cellulosenitratfilter BA 85/1 (Porenweite 0.45 µm)
von SCHLEICHER & SCHÜLL, Dassel.

Sterilfiltergeräte NALGENE über LS-LABORSERVICE, München.

7.1.3. Reagentien und Enzyme

Die Reagentien für die Zellkutlur sind anderswo (Traber, 1976) beschrieben.

Alle im folgenden nicht aufgeführten Chemikalien wurden von MERCK, Darmstadt, bezogen und besaßen den höchsten erhältlichen Reinheitsgrad.

Alle organischen Lösungsmittel (p.a.) lieferte C. ROTH, Karlsruhe.

Serum wurde freundlicherweise von der Blutbank Würzburg (Prof. Dr. G.Gathoff) zur Verfügung gestellt.

Leu- und Met-Enkephalin waren ein Geschenk der Professoren L.Moroder und E.Wünsch, Martinsried.

Die Alkalische Phosphatase aus menschlicher Leber war ein Geschenk von Prof. O.Wieland, München.

Enzyme:

Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin, Alkalische Phosphatase (Kälberdarm) von BOEHRINGER, Mannheim.
Proteinase K (Best.Nr.: 24568) von MERCK, Darmstadt.
Pronase von SERVA, Heidelberg.
Phospholipase C (Clostridium perfringens, Typ X) von SIGMA, München.
Neuraminidase (Vibrio comma) von BEHRINGWERKE, Marburg.

Humanserumalbumin, fettsäureverarmt (Best.Nr.: A 1887), Humanserumalbumin, globulinverarmt (Best.Nr.: A 8763), 1-0-Alkyl-2-acetylglyceryl-3-phosphorylcholin (PAF) (Best.Nr.: P 9525), Bilirubin, Biliverdin, Lysolecithin (Eiklar), L-Noradrenalin, Trypsininhibitor (Sojabohne), Phosphatidsäure (Eiklar), Immunglobulin G, Ovalbumin (Huhn), Dansylchlorid, Aktivkohle von SIGMA, München.

Rinderalbumin (reinst), Ninhydrin-Fertigspray von MERCK, Darmstadt.

Ampholine (pH 3.5 - 10) von LKB, Gräfelfing.

ZK 62 711 (Rolipram) von SCHERING, Berlin.

1-O-Alkyl-glyceryl-3-phosphorylcholine (2-Lyso-PAF) von CALBIOCHEM, Gießen.

Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X von TRAVENOL, München.

DL-Isopropylarterenol·HCl (Isoproterenol) von SERVA, Heidelberg.

7.2. Zellkultur

7.2.1. Methode

Sämtliche Routinemethoden sind beschrieben (Traber, 1976).

Als Inkubationsmedium wird DMEM verwandt, in dem $NaHCO_3$ durch 25 mmol/l Hepes (pH 7.4) ersetzt wird und Glucose in einer Endkonzentration von 20.5 mmol/l zugegen ist.

7.2.2. Anzucht in serumfreiem Medium

Die Zellen werden im Anzuchtkolben wenige Minuten mit 5 ml Trypsinlösung [0.05 %(w/v)] bei Raumtemperatur inkubiert. Leichtes Klopfen auf die Kolbenrückwand

beschleunigt die Ablösung der Zellen. Die Enzymaktivität wird durch Zusatz von 10 ml serumhaltigem [10 %(v/v)] DMEM-Medium beendet (Traber, 1976). Nach der Zentrifugation wird der Zellniederschlag in serumfreiem DMEM-Medium resuspendiert (Waschen ist nicht erforderlich). Die Zellen werden gezählt, im selben Medium auf eine Endkonzentration von 50000 Zellen je ml verdünnt und in 1 ml-Portionen auf die Kleinkulturschalen der 24 fach-Gewebekulturplatten (COSTAR) verteilt. Aufgrund der starken Meniskusbildung in den einzelnen Kleinkulturschalen (Durchmesser 15 mm) ist eine homogene Zellverteilung am Schalenboden im Routinebetrieb nicht möglich. Man beobachtet immer eine wesentlich höhere Zelldichte auf der Schalenrandfläche. Die Zellteilungsrate sinkt in Abwesenheit von Serum auf Null (Wagner, 1978). Die Zellen werden zwischen 40 und 48 h lang ohne weitere Zusätze kultiviert.

7.2.3. Gliomazellinie C6-BU-1

C6-BU-1 ist die Bezeichnung für die gegen 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BUdR) resistente Mutante (Amano et al., 1974) des Klones Nr. 6 einer Gliomazellinie. Diese Zellen C6 wurden 1968 aus einem mit N-nitroso-N-methyl-Harnstoff induzierten Hirntumor einer Ratte isoliert (Benda et al., 1968). Die Gliomazellinie C6-BU-1 wird in 90 %(v/v)DMEM/10 %(v/v)FCS-Medium in Gegenwart von 0.1 mmol/l BUdR kultiviert.

7.2.4. Leberzellinie BRL-3C4

BRL-3C4 ist die Bezeichnung für eine klonale Zellinie von differenzierten Leberzellen, die 1968 aus der Leber einer zwei Wochen alten Ratte gewonnen wurden (Coon, 1968). Diese Zellinie ist nicht transformiert. Ihre Eigenschaften als Leberzellinie sind durch die Sekretion von acht spezifischen Leberproteinen charakterisiert. Sie wird routinemäßig in 95 %(v/v) DMEM/5 %(v/v)FCS-Medium kultiviert.

In älteren Kulturen (über 10 Tage) haften die Zellen sehr fest am Boden des Anzuchtkolbens und können auch unter drastischen Bedingungen nur mehr partiell subkultiviert werden.

Bei Erhalt der Zellen war die Passagenummer unbekannt. Sie wurde deshalb mit "n" bezeichnet und fortan weitergezählt (Beispiel: n + 6).

7.3. Routinemethoden

7.3.1. Serumgewinnung

Das humane Mischserum (zwischen 4 h und 21 h alt bei 4 ^{o}C) wurde freundlicherweise von der Blutbank Würzburg zur Verfügung gestellt. Proben von Spendern mit starker Lipämie wurden aus technischen Gründen nicht verwandt. Lipämie selbst hat jedoch keinen Einfluß

auf den Diabolingehalt des Serums (Wagner, 1978). Die noch vorhandenen zellulären Bestandteile werden sedimentiert (3400 g; 10 min; 4 °C; Hettich). Der klare Überstand wird nach Inaktivierung des Komplementsystems (30 min; 56 °C) in 50 ml-Portionen unsteril eingefroren.

7.3.2. Herstellung des Acetonpulvers

Die Durchführung erfolgt in Abänderung des üblichen Vorgehens bei 4 °C. 50 ml Serum werden innerhalb von 15 min unter Rühren in den zehnfachen Überschuß eiskalten Acetons getropft. Danach wird die farblose Aufschlämmung noch 5 min weitergerührt, zentrifugiert (3400 g; 5 min; 4 °C; Hettich) und der vereinigte Niederschlag nochmals mit 50 ml kalten Acetons gewaschen. Der Niederschlag der anschließenden zweiten Zentrifugation (gleiche Bedingungen) wird in einer Kristallisierschale ausgebreitet, mit einem Papierhandtuch abgedeckt und über Nacht ohne zusätzliche Heizung gefriergetrocknet. Das Pulver (4.0 ± 0.16/mg Protein) wird vorzugsweise trocken oder nach Auflösung in PBS/Azid (Seq) und anschließender hochtouriger Zentrifugation (12000 g; 10 min; 4 °C; Sorvall, geringfügiger brauner Rückstand verworfen) eingefroren.

7.3.3. Probenvorbereitung und Reaktivierung

0.2 ml einer methanolischen Lösung (Seq) des proteinfreien Diabolins werden in einem Zentrifugengläschen im Speed vac Concentrator (Rotor 1275 bzw. 4015) unter Ölpumpenvakuum ohne Infrarot-Heizung eingetrocknet, in 0.16 ml eiskaltem PBS aufgenommen (1.25 Seq) (Beschallung ist nicht erforderlich) und mit 40 µl wässeriger 30 %(w/v) fap-HSA-Lösung versetzt (Seq). Nach der Durchmischung werden die Proben 20 min lang im Wasserbad bei 45 °C inkubiert (MacLouf et al., 1980) und anschließend, falls nötig, mit PBS verdünnt. Bei den Eluaten aus den Kieselgel-Dünnschichtplatten muß vor Zusatz des Serumalbumins auf neutralen pH-Wert der Lösung geachtet werden (HCl/NaOH).

Die von vornherein wässerigen Proben werden sofort mit HSA-Lösung versetzt und wie oben inkubiert.

7.3.4. Inkubation der Testzellen

Das miniaturisierte Testsystem in 24 fach-Gewebekulturplatten ist beschrieben (Glaser, 1981). Diese Vorschrift wird nur in zwei Punkten verändert. Zum einen wird die 10 min Inkubation auf dem Wasserbad durch Kühlung in einem Eisbad beendet (kein erkennbarer Unterschied bei Verwendung von Trockeneis/Ethanol), zum anderen wird das Inkubationsvolumen auf

0.25 ml reduziert (Verwendung einer Repettierpipette). Die Bestimmungen werden in Triplikaten durchgeführt. Auf jeder Mehrfach-Gewebekulturplatte bleiben die ersten und letzten drei Kleinkulturschalen den Kontrollen (ungehemmte Grundstimulation) vorbehalten.

7.3.5. Bestimmung des gebildeten cyclo AMP

Die Reinigung und Bestimmung des intrazellulären cyclo AMP ist beschrieben (Glaser, 1981) und wird mit folgenden Änderungen übernommen.

1. Die Eichkurve erstreckt sich von 0.2 bis 10 pmol nachweisbarem cyclo AMP.
2. Radioaktiv markierter Ligand und Puffer werden in einem Pipettierschritt vorgelegt (10 µl mol/l Phosphat-Puffer, pH 6.0, 16.7 kBq [^{3}H]cyclo AMP) (Vorschlag von F.Löffler).
3. Das Aufnahmevolumen nach der Gefriertrocknung beträgt 0.4 ml, wovon je 0.15 ml zur cyclo-AMP- und Ausbeutebestimmung verwandt werden.

7.3.6. Bestimmung der Ausbeute

Die Bestimmung der Verluste an cyclo AMP während der Reinigungsprozedur ist beschrieben (Traber, 1976). Dabei werden 6.0 kBq [^{3}H]cyclo AMP in 50 µl BSA--Lösung [0.1 %(w/v)] je Kleinkulturschale eingesetzt.

7.3.7. Proteinbestimmung

Nicht wegwaschbares Zellprotein sowie der Proteingehalt der Serumfraktionen werden nach herkömmlicher Methode mit Rinderserumalbumin als Standard bestimmt (Lowry et al., 1951).

Die alternative Bestimmungsmethode durch Coomassie Blue-Färbung (Bradford, 1976) führt in unseren Händen nur bei der Proteinbestimmung der Serumfraktionen zu vergleichbaren Ergebnissen (gleicher Standard). Alle angegebenen Werte stützen sich auf die erstgenannte Methode.

Die Bestimmung wird mit vier äquidistanten Probenvolumina durchgeführt. Die Extinktionen bei 750 nm werden an einem Zeiss-Photometer PM 6 mit BCD-Schnittstelle PI 97A und direkt angeschlossenem, jedoch autonomem Kleinrechner HP 97 gemessen. Die Proteinmenge (bzw. -gehalt) wird "on line" aus der Steigung der Regressionsgeraden ermittelt, die aller Erfahrung nach nur in Ausnahmefällen durch den Koordinatenursprung verläuft. Die Programmlogik sucht selbständig nach groben Ausreißern und läßt gegebenenfalls maximal einen davon unberücksichtigt. Die Kontrolle der Güte der jeweiligen linearen Regression ist dabei in jedem Einzelfall gewährleistet.

7.3.8. Datenaufbereitung

Über die Steigung einer Eichgeraden wird, unter Einbeziehung der Ausbeuten, des Verdünnungsfaktors und der Proteinmenge je Kleinkulturschale der intrazelluläre Gehalt an cyclo AMP in [pmol/mg Protein] und die Standardabweichung der Stichprobenmenge errechnet. Von wenigen Ausnahmen abgesehen wird anschließend die prozentuale Erniedrigung des cyclo AMP-Gehalts +/- Standardabweichung gegenüber der ungehemmten Grundstimulation ermittelt.

Die Standardabweichung linear kombinierter Größen wird über $S_{1,2} = \sqrt{S_1^2 + S_2^2}$ berechnet.

7.3.9. Vorbehandlung von Dialyseschläuchen

Die Durchführung erfolgt nach einer bekannten Vorschrift (Clark & Switzer, 1977). Die Dialyseschläuche werden mit ihren Enden an einen Magnetfisch gebunden und in 1 l $NaHCO_3$-Lösung (1 %(w/v), 100 ppm Na_2H_2EDTA) 5 min lang ausgekocht. Die Flüssigkeit wird dekantiert und der Kochschritt noch zweimal wiederholt. Anschließend werden die Schläuche zweimal in je 1 l destilliertem Wasser gekocht und in wässeriger NaN_3-Lösung [0.02 %(w/v)] bei 4 °C aufbewahrt.

7.4. Versuchsbeschreibungen

7.4.1. Versuche zur Isolierung

7.4.1.1. Adsorption von proteingebundenem Diabolin an DEAE-Cellulose

Sämtliche Manipulationen werden im Kühlraum (4 °C) durchgeführt. Die DEAE-Cellulose (DE 52) wird nach Angaben des Herstellers (Whatman, 1978) vorbehandelt ("Precycling"). 0.28 l des gequollenen Gels werden mit 50 mmol/l NH_4OAc-Puffer (pH 7.5) äquilibriert und in einem 500 ml Meßzylinder (hohe Form) dreimal weitgehend von "fines" befreit.

2 g Acetonpulver, gelöst in 25 ml desselben Puffers, werden während 5 h unter gelegentlichem Umkippen an den Austauscher gebunden. Der Überstand wird abgenommen und das Gel viermal durch Zusatz von je 0.15 l des Auftragspuffers gewaschen (Inkubationsdauer je 10 bis 15 min). Die vereinigten Waschüberstände ebenso wie der Auftragsüberstand werden lyophilisiert und in 25 ml desselben Puffers (Seq) aufgenommen.

Analog wird bei der folgenden Desorption mit viermal je 0.15 l 0.5 mol/l NH_4OAc-Puffer (pH 6.5) verfahren. Der Rückstand nach Lyophilisation wird jedoch ebenfalls im ionenschwächeren Puffer aufgenommen.

Bei der Säulenchromatografie von proteingebundenem Diabolin an DEAE-Cellulose (Kap. 7.4.1.3.) wird das identische Gelmaterial ohne weiteres "Precycling", sowie das identische Hochsalzeluat im Auftragspuffer verwandt.

7.4.1.2. Adsorption von proteinfreiem Diabolin an Säulenmaterial

Ein Milliliter methanolische Diabolinlösung wird im Speed vac Concentrator eingedampft und im gleichen Volumen 25 mmol/l Tris-Puffer (pH 7.4 bei 4 °C) (Seq) aufgenommen. Danach wird 1 ml eines dreimal gewaschenen Gels zugesetzt und 30 min lang bei 4 °C unter gelegentlichem Aufschlämmen gehalten. Anschließend wird der Ansatz zentrifugiert (3400 g; 5 min; 4 °C; Hettich) und der Überstand abgenommen. Alle folgenden Desorptionsversuche werden immer zweifach mit je 1 ml Puffer in gleicher Weise durchgeführt. Das fap-HSA [1 %(w/v)] wird in 25 mmol/l Tris-Puffer (pH 7.4) gelöst.

Die Anionenaustauscher werden mit je 1 mol/l NaOAc-Puffer (pH 4.0) (DEAE-Typen) bzw. 1 mol/l Glycin-HCl-Puffer (pH 2.0) (Phospho-Cellulose) entladen, der Kationenaustauscher mit 1 mol/l NaOAc-Puffer (pH 6.0) (CM-Cellulose) desorbiert.

Die vereinigten Überstände der jeweils doppelten Elutionen werden vor ihrem Einsatz im biologischen Testsystem mit 5 mol/l NaOH neutralisiert.

7.4.1.3. Säulenchromatografie an DEAE-Cellulose

Sämtliche Manipulationen werden im Kühlraum (4 °C) durchgeführt. Für die Säulenchromatografie des proteingebundenen Diabolins wird ohne weiteres

"Precycling" die identische DEAE-Cellulose (DE 52) verwandt,die schon bei der Adsorption im "batch"--Verfahren eingesetzt wurde (Kap. 7.4.1.1.). Das Säulenmaterial wird nach Angaben des Herstellers (Whatmann, 1978) mit 50 mmol/l NH_4OAc-Puffer (pH 6.5) äquilibriert und in einer Plexiglas-Säule (2 x 100 cm) zu einer Betthöhe von 90 cm gepackt. Danach wird weitere 35 h lang mit demselben Puffer gewaschen. Anschließend werden 25 ml des lyophilisierten Hochsalzeluats (Kap. 7.4.1.1.) in 50 mmol/l NH_4OAc--Puffer (pH 6.5) aufgetragen und nach 5.5 h mit einem exponentiellen Ionenstärke-Gradienten (2 x 0.5 l) bis zu 0.5 mol/l NH_4OAc-Puffer (pH 6.5) unter folgenden Randbedingungen eluiert.

Elutionsgeschwindigkeit: 65 ml/h
Fraktionsvolumen: 6.2 ml
Vollausschlag der Absorption (280 nm): 0.5 OE
Papiervorschub: 6 cm/h

Anschließend wird mit 300 ml 1 mol/l NaCl in Auftragspuffer regeneriert.

7.4.1.4. Chromatografie an einer Kieselgelsäule

Die Durchführung erfolgt im Kühlraum (4 °C). Eine publizierte Vorschrift (Rouser et al., 1976) wird modifiziert. Das Kieselgel (Bio-Sil HA, minus 325 mesh oder Typ G 60) wird vor seiner Verwendung 2 h lang auf 100 °C erhitzt.

Eine Glassäule (1.5 x 20 cm) mit Schliffansatz und Ausgangsolive (kein Schliffhahn) wird mit Glaswolle, Seesand (0.5 cm) und 15 ml Chloroform gefüllt. In dieser Säule wird eine Aufschlämmung von Kieselsäure in Chloroform (1 g Kieselgel in 2 ml Chloroform) bis zu einer Betthöhe von 17 cm gefüllt und mit 100 ml Aceton gewaschen (Säule wird trüb). 10 ml des Acetonüberstandes nach Proteinase K-Behandlung (Kap. 7.4.2.1.) (Seq) werden auf die Säule aufgesetzt und mit 0.4 l Aceton gewaschen (Höhendifferenz mindestens 1.5 m). Bei der anschließenden Elution mit 0.3 l Methanol enthalten die ersten 80 ml die gesamte Diabolinaktivität.

Nach Durchlauf des restlichen Methanols wird das Gel mit 0.15 l Aceton in der Säule äquilibriert. Das Adsorbens ist wieder verwendbar und zeigt mindestens bis zum achten Lauf keinen Verlust an Trennleistung.

7.4.1.5. Chromatografie an Kieselgelplatten (analytisch)

Für die Chromatografie werden Dünnschicht-Fertigplatten (20 x 20 cm, 0.25 mm) verwandt. Je 50 µl der methanolischen Proben (Seq) werden punktförmig, 2 cm voneinander und vom unteren Rand entfernt mit einer 5 µl-Kapillare aufgetragen und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Chromatografietröge werden, wenn nicht anders angegeben, 2 h lang mit einem Laufmittel (Nichols, 1964) aus Chloroform (40 Volumenteile), Methanol (25 Vt), Aceton (3 Vt), Essigsäure (7 Vt) und Wasser (2 Vt) äquilibriert. Die Laufzeit beträgt 3 h.

Nach beendetem Lauf wird die Lösungsmittelfront markiert und die Platte 20 min lang an der Luft getrocknet. Die Lokalisierung der einzelnen Flecken erfolgt durch bloße Inspektion unter UV-Licht (254 nm), Markierung mit Iod-Dampf (Marinetti, 1964), Besprühen mit Rhodamin 6 G-Lösung (Marinetti & Stotz, 1956) bzw. Ninhydrin-Fertigspray oder Verkohlung mit konzentrierter Schwefelsäure.

7.4.1.6. Chromatografie an Kieselgelplatten (präparativ)

Für die Chromatografie werden Dünnschicht-Fertigplatten (20 x 20 cm, 2,5 mm) verwandt. Die Platten werden routinemäßig im vorgesehenen Laufmittel über Nacht entwickelt und das Gel anschließend mit einer Rasierklinge ca. 4 mm unter der gelben Lösungsmittelfront durchtrennt.

Die methanolischen Proben werden punkt- (0.5 ml Serumäquivalente) oder strichförmig (1 ml Serumäquivalent/cm) mit einer 50 µl Hamiltonspritze aufgetragen und im Stickstoffstrom getrocknet. Jeweils 3 cm von den Strichenden entfernt wird zusätzlich je ein punktförmiger Fleck aufgetragen.

Nach Entwicklung in einem äquilibrierten Tank wird die Laufmittelfront markiert und die Platte über Nacht im Vakuum getrocknet. Der Mittelteil der Platte wird anschließend mit einer Plastikfolie abgedeckt und die beiden Randstreifen mit Iod-Dampf oder Rhodamin 6 G-Lösung (Kap. 7.4.1.5.) besprüht. Die zu eluierenden Flächen werden markiert (als Kontrolle dient ein senkrechter, 1 cm breiter Streifen über die gesamte Lauf-

strecke), ausgekratzt und das Gel in 15 ml Plastikspritzen-Zylinder überführt, die am unteren Ende ein feines Nylonnetz abschließt (Zubehör für die isoelektrische Fokussierung, LKB, Gräfelfing). Anschließend wird mit 15 bis 25 ml Methanol je nach Flächengröße in kleine Spitzkölbchen eluiert. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum (30 °C) wird der Rückstand in Methanol zur Serumäquivalenz aufgenommen und durch eine Pasteurpipette,gefüllt mit GF/C-Filter (Schiltz et al., 1977), gepreßt. Das teilchenfreie Filtrat wird tiefgefroren.

7.4.1.7. Molekularsiebchromatografie

Die Durchführung erfolgt im Kühlraum (4 °C). Die Vorbereitung des Säulenmaterials Sephadex G-100-Superfine folgt der Herstellervorschrift (Pharmacia, 1981). Das Gel wird in PBS/Azid gequollen, entgast und in einer Plexiglassäule (5 x 100 cm) zu einer Betthöhe von 83 cm gepackt. Die Auftrennung von jeweils 1.6 g Acetonpulver in 20 ml PBS (Seq) erfolgt im gleichen Laufmittel unter folgenden Randbedingungen.

Elutionsgeschwindigkeit: 23 ml/h
Fraktionsvolumen: 11.2 ml
Vollausschlag der Absorption (280 nm): 2.0 OE
Papiervorschub: 0.1 mm/min

Das Ausschlußvolumen (Dextranblau) erscheint nach 2.5 h ab Fraktion 51. Die Säule ist wieder verwendbar. Zwischen den einzelnen Läufen wird mindestens 24 h lang mit PBS gespült.

7.4.1.8. Chromatografie an Concanavalin A-Sepharose

Mit Concanavalin A gekoppelte Sepharose (5 ml) wird zweimal mit 50 mmol/l Tris-Puffer [pH 7.5 bei 4 °C, 0.2 mmol/l NaCl, 10 mmol/l $CaCl_2$, 1 mmol/l $MgCl_2$] gewaschen und absitzen lassen.

80 mg Acetonpulver werden in 3 ml desselben Puffers (0.33 Seq) gelöst und mit 2 ml abgesessener Sepharose 30 min lang bei 4 °C leicht gerührt. Ein Parallelansatz läuft zusätzlich mit 0.5 %(w/v) α-Methylmannosid. Nach der anschließenden Zentrifugation (12000 g; 10 min; 4 °C) wird der Überstand durch Glaswolle filtriert und eingefroren.

7.4.1.9. Chromatografie an Hydroxylapatit

Die Herstellung der Apatits erfolgt nach einer bekannten Vorschrift (Levin, 1962). Die Säulenchromatografie wird im Kühlraum (4 °C) durchgeführt.

Frischer Hydroxylapatit wird in eine Kunststoffsäule (2.5 x 50 cm) zu einer Gelbetthöhe von 40 cm gefüllt und 24 h lang mit 10 mmol/l K-Phosphat-Puffer (pH 7) gewaschen (65 ml/h). 0.8 g Acetonpulver werden in 20 ml desselben Puffers gelöst (0.5 Seq). Die Probe wird auf die Säule in zwei 10 ml-Portionen aufgesetzt, die durch 5 ml Puffer zwischengespült werden. Die Elution von der Säule erfolgt unter folgenden Randbedingungen.

Elutionsgeschwindigkeit: 65 ml/h
Fraktionsvolumen: 20 ml

Vollausschlag der Absorption (280 nm): 0.2 OE
Papiervorschub: 3 cm/h

Nach 6 h Laufzeit wird ein linearer Ionenstärke--Gradient (Gilson-Gradientenmischer) bis 0.3 mol/l K-Phosphat-Puffer (pH 7) über 24 h angelegt. Die Proben werden tiefgefroren.

7.4.1.10. Affinitätschromatografie an Cibacron Blue F-3-GA

Die Chromatografie wird nach einer Herstellervorschrift (Biorad, 1980) im Kühlraum (4 °C) durchgeführt. 33 ml Gelsuspension (Kapazität: 1.75 mg Serumalbumin/ml) werden entgast, in einen 50 ml--Plastikspritzen-Zylinder mit Glaswolle-Verschluß gefüllt, mit 170 ml wässeriger 40 %(v/v) 2-Propanol--Lösung der nicht gebundene Farbstoff eluiert und mit 100 ml Wasser nachgewaschen. Anschließend wird das Gel mit 100 ml 10 mmol/l K-Phosphat-Puffer (genau pH 7.25, 0.15 mol/l NaCl) [= Puffer A] äquilibriert und der gesamte Serumalbumin-Gipfel [dritter Aktivitätsgipfel (Fraktionen 71-91) einer Molekularsiebschromatografie von Acetonpulver an Sephadex G-100-Superfine (Kap. 7.4.1.7.)] aufgetragen.

Der Durchlauf wird mit den 70 ml Puffer A vereinigt, mit denen die Säule anschließend nachgewaschen wird [= Durchlauf]. Die Elution des Serumalbumins erfolgt mit 100 ml 1.4 mol/l NaCl-Lösung in Puffer A [= Eluat], die Regeneration der Säule mit 70 ml 8 mol/l Harnstoff-Lösung ebenfalls in Puffer A [= Regenerat].

Nach Durchlauf von weiteren 100 ml Puffer A (verworfen) wird die wiederholt verwendbare Säule im selben Puffer mit 0.02 %(w/v) NaN_3 aufbewahrt. Spätestens nach 10 Tagen muß erneut freier Farbstoff ausgewaschen werden.

Durchlauf, Eluat und Regenerat werden über Nacht gegen 4 x 400 ml PBS bei 4 °C dialysiert, das Regenerat zuerst 4 h lang bei Raumtemperatur.

7.4.1.11. Adsorption an Aktivkohle

Die Adsorption wird in Anlehnung an eine bekannte Vorschrift (Chen, 1967) durchgeführt.

0.1 g Acetonpulver werden in 1.25 ml 0.1 mol/l K-Phosphat-Puffer (pH 7.4) (Seq) gelöst und 1 h lang mit 50 mg Aktivkohle und 5 mg Dextran T40 bei 4 °C bzw. 56 °C inkubiert. Durch Zusatz von 2 mol/l HCl wird gegebenenfalls vorher der pH-Wert des Ansatzes auf pH 3 gesenkt. Nach einer anschließenden Zentrifugation (48000 g; 20 min; 4 °C) wird der klare Überstand eingefroren.

Die Elution erfolgt mit je 1.25 ml des angegebenen (Kap. 3.7.3.) Lösungsmittels in analoger Weise. Bei den Versuchen mit den Alkoholen scheint die Aktivkohle zu dispergieren, was eine anschließende Filtration des Zentrifugationsüberstandes über Glasfaser erforderlich macht.

7.4.1.12. Chromatografie in organischem Laufmittel

Die Chromatografie wird im Kühlraum (4 °C) mit kalten Lösungsmitteln durchgeführt.

Hydroxyisopropyl-Sephadex (LH 20) wird 3 h lang in Methanol vorgequollen und nach Herstellervorschrift (Pharmacia, 1981) in eine Plexiglas-Säule (2 x 100 cm) zu einer Betthöhe von 96 cm gepackt. 2 ml des Methanolextraktes aus Acetonpulver (Kap. 7.4.1.14) (10 Seq) werden aufgetragen. Die Trennung erfolgt in Methanol unter folgenden Randbedingungen.

Elutionsgeschwindigkeit: 14.5 ml/h
Fraktionsvolumen: 6.6 ml
Vollausschlag der Absorption (280 nm): 0.05 OE
Papiervorschub: 0.2 mm/min

Die Säule ist wieder verwendbar. Zwischen den einzelnen Läufen wird mindestens 24 h lang mit Methanol gespült.

7.4.1.13. Lösungsmittelextraktion von Acetonpulver im "batch"-Verfahren

Jeweils 0.4 g des lyophilisierten Acetonpulvers werden in einem 20 ml Rundkölbchen mit 5 ml (Seq) Lösungsmittel(gemisch) überschichtet. Allen sauren MeOH-Extraktionen wird zusätzlich 0.5 ml 1 mol/l Glycin-HCl-Puffer (pH 2.0) zugesetzt. Diejenigen Ansätze, die erhitzt werden, verschließt ein Rückflußkühler, die anderen ein Schliffstopfen. Nach beendeter Extraktion unter gelegentlichem Schütteln (30 min) wird der gesamte Kolbeninhalt in einen

50 ml-Zentrifugenbecher überführt, zentrifugiert (3400 g; 20 min; 4 °C; Hettich) und der Überstand tiefgefroren. Vor Versuchsbeginn werden die Proben wie üblich (Kap. 7.3.3.) eingedampft und nach Aufnahme des Rückstandes in PBS neutralisiert.

7.4.1.14. Lösungsmittelextraktion von Acetonpulver im Säulenverfahren

Die Extraktion wird bei Raumtemperatur durchgeführt. Eine Glassäule (1.5 x 30 cm) mit Ausgangsolive (kein Schliffhahn) wird mit Glaswolle verschlossen und 8 g trockenes Acetonpulver eingefüllt. Anschließend wird mit 0.25 l Methanol langsam (20 Tropfen/min) bei Raumtemperatur eluiert. Das Methanol wird am Rotationsverdampfer abgezogen, der farblose Rückstand in 10 ml Methanol aufgenommen (10 Seq) und tiefgefroren.

In einigen Fällen wurden statt Methanol auch andere Lösungsmittel eingesetzt (Abb.22).

7.4.2. Versuche zur Charakterisierung

7.4.2.1. Behandlung mit Proteinase K

In einem 50 ml-Zentrifugenbecher werden 4 g trockenes Acetonpulver in 50 ml PBS/Azid (Seq) aufgeschlämmt, mit 10 mg (bzw. 100 mg) Proteinase K versetzt und 24 h lang in einem Wasserbad bei 37 °C gerührt.

Die Inkubation wird entweder durch Zusatz von 100 µl wässeriger 10 %(w/v) SDS-Lösung [Endkonzentration 0.02 %(w/v)] beendet oder durch eine anschließende Acetonfällung (Kap. 7.3.2.) unterbrochen. In diesem Fall wird das Lösungsmittel des Acetonüberstandes im Vakuum abgezogen, der farblose Rückstand in 50 ml Methanol (bzw. Chloroform) (Seq) gelöst und bei -20 °C tiefgefroren.

7.4.2.2. Behandlung mit Trypsin

0.24 g Acetonpulver werden in 3 ml 50 mmol/l Tris--Puffer (pH 7.5 bei 37 °C) gelöst (Seq) und mit 1.8 mg Trypsin in 3 ml desselben Puffers gemischt (Endkonzentration 0.5 Seq). Während der Inkubation im Wasserbad werden nach 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 1.5, 2 h und 3 h je 0.6 ml des gerührten Reaktionsansatzes entnommen, mit 10 µl Trypsininhibitor--Lösung (0.1 mg/ml in 50 mmol/l Tris-Puffer, pH 7.5) gemischt und zusammen mit den Kontrollen eine halbe Stunde lang bei 25 °C inkubiert. Die Proben werden bis zur Verwendung tiefgefroren.

7.4.2.3. Behandlung mit Pepsin

0.4 g Acetonpulver werden in 5 ml 0.1 mol/l Glycin--HCl-Puffer (pH 1.5, 0.1 mol/l NaCl) (Seq) aufgenommen, mit 2.5 mg Pepsin versetzt und bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Mit einer pH-Elektrode wird fortlaufend der pH-Wert des Reaktionsansatzes verfolgt und mit 5 mol/l HCl entsprechend nachgestellt. Nach 3.5 h Inkubationszeit tritt innerhalb von 10 min keine

signifikante Änderung des pH-Wertes mehr auf. Die Reaktionsmischung wird tiefgefroren und zusammen mit den Kontrollen lyophilisiert. Nach dem Auflösen der Rückstände in 5 ml Wasser (Seq) wird mit 1 mol/l NaOH-Lösung neutralisiert und bis zur Verwendung erneut eingefroren.

7.4.2.4. Behandlung mit Alkalischer Phosphatase

0.25 g Acetonpulver werden in 5 ml 0.5 mol/l Triethanolamin-HCl-Puffer (pH 9.8, 25 mmol/l $MgCl_2$, 5 nmol/l $ZnCl_2$) gelöst (0.5 Seq), mit 0.25 ml Alkalischer Phosphatase (10 mg/ml) gemischt und bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Nach 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 1.5 h, 2 h und 3 h werden der Reaktionsmischung Aliquots (0.5 ml) entnommen, diese durch Zusatz von 35 µl 5 mol/l HCl auf annähernd pH 6 gebracht und zusammen mit den Kontrollen über Nacht gegen 2 x 50 ml PBS/Azid bei 4 °C dialysiert (Brand & Stansbury, 1979).

Die analogen Versuche werden anstatt mit Acetonpulver mit der entsprechenden Menge Rückstand durchgeführt, der nach Abdampfen des Lösungsmittels (Stickstoffstrom) aus 2.5 ml (Seq) des Methanoleluats einer Kieselgelsäule (Kap. 7.4.1.4.) zurückbleibt.

7.4.2.5. Behandlung mit Neuraminidase

Die Behandlung wird in Anlehnung an eine bekannte Vorschrift (Schramm & Mohr, 1959) mit Neuraminidase aus Vibrio comma durchgeführt.

Acetonpulver wird in 50 mmol/l NaOAc-Puffer (pH 5.5, 154 mmol/l NaCl, 9 mmol/l $CaCl_2$) (Seq) aufgenommen. 0.2 ml dieser Lösung werden in einem Zentrifugengläschen mit 1.4 ml desselben Puffers und 0.4 ml Neuraminidase-Lösung (500 U/ml) gemischt und 3 h lang im Wasserbad bei 37 °C unter Rühren inkubiert. Die Enzymaktivität eines 1 ml-Aliquots wird durch Kochen (2 min; 96 °C) beendet und anschließend hochtourig zentrifugiert. Jeweils 0.5 ml des gekochten wie des ungekochten Überstandes einschließlich aller Kontrollen werden über Nacht gegen 2 x 200 ml PBS/Azid dialysiert und bis zur Verwendung eingefroren.

7.4.2.6. Behandlung mit Phospholipase C

Die Durchführung folgt einer bekannten Vorschrift (Ottolenghi, 1969).

Ein Milliliter des Methanoleluats einer Kieselgelsäule (Kap. 7.4.1.4.) wird in einem 12 ml-Schliffzentrifugenglas im Stickstoffstrom eingedampft. Der Rückstand wird in 2 Tropfen Methanol gelöst und mit 1 ml einer trüben (98 + 2) Diethylether/Ethanol-Mischung vesetzt. Nach Zusatz von 0.3 ml einer Lösung

von Phospholipase C (1 mg/ml) in 0.1 mol/l Tris--Puffer (pH 7.2 bei 20 °C; 20 mmol/l $CaCl_2$) wird gemischt und der verschlossene Reaktionsansatz samt Kontrollen 3 h lang (bzw. über Nacht oder gar nicht) bei Raumtemperatur stehengelassen.

Nach dem Eindampfen der Lösungsmittel im Stickstoffstrom werden je 2 ml Methanol und Chloroform, sowie 1.8 ml Wasser zugesetzt, gemischt, zentrifugiert (600 g; 2 min; 4 °C; Hettich) und die beiden Phasen getrennt. Die hydrophile Oberphase wird erneut eingedampft und in 0.8 ml PBS (1.25 Seq) aufgenommen. Die Chloroformphase wird sofort tiefgefroren und erst kurz vor ihrer Verwendung zur Trockne gebracht.

7.4.3. Versuche zur Strukturaufklärung

7.4.3.1. Veresterung unter milden Bedingungen

Die Veresterung folgt einer Vorschrift von Kates (1972b). 0.5 ml des Methanolextraktes aus Acetonpulver (Kap. 7.4.1.4.) (Seq) werden in einem 12 ml--Schliffzentrifugengläschen (NS 14.5) im Stickstoffstrom eingedampft. Der Rückstand wird mit 0.2 ml Chloroform, 0.3 ml Methanol und weiteren 0.5 ml einer methanolischen 0.2 mol/l NaOH-Lösung in dieser Reihenfolge versetzt, gemischt und 15 min lang verschlossen bei Raumtemperatur belassen. Daran anschließend werden noch einmal 0.2 ml Methanol, 0.3 ml Chloroform und 0.9 ml Wasser zugesetzt, wiederum gemischt und sofort niedertourig zentrifugiert (600 g; 1 min; 4 °C; Hettich).

Die hydrophile Oberphase wird so vollständig wie möglich mit einer Pasteur-Pipette abgenommen und in ein 12 ml-Zentrifugenglas überführt, in dem 0.5 ml zweimal gewaschener Kationenaustauscher (H^+-Form) vorliegen. Nach heftigem Aufrühren (1 min) stellt sich ein pH-Wert von annähernd pH 6 ein (pH-Papier). Nach einer kurzen Zentrifugation (600 g; 1 min; 4 °C; Hettich) wird der Überstand abgenommen.

Die Chloroformphase wird zweimal mit je 0.5 ml Methanol/Wasser (1.1 + 1) gewaschen und mit den vereinigten Waschüberständen des Kationenaustauschers noch einmal extrahiert. Nach Zusatz von 10 µl methanolischer 1.5 mol/l NH_4OH-Lösung zu den vereinten Methanol/Wasser-Phasen sind diese neutral. Sie werden im Vakuum (Speed vac Concentrator) getrocknet, der Rückstand in 0.4 ml PBS aufgenommen (1.25 Seq) und eingefroren. Die Chloroformphase wird bis zur Verwendung bei -20 °C gehalten.

7.4.3.2. Dansylierung

Die Dansylierung folgt einer von E. Schiltz (persönliche Mitteilung, 1982) modifizierten Vorschrift (Gray & Hartley, 1963) in unbehandelten Glasröhrchen (0.6 x 5 cm).

0.1 ml des Methanolextraktes aus Acetonpulver (Kap. 7.4.1.4.) (10 Seq) werden im Vakuum (Speed vac Concentrator) eingedampft (Kontrolle mit 0.1 ml Methanol). Nach Zusatz von 30 µl einer wässerigen 0.2 mol/l $NaHCO_3$-Lösung wird wie oben zur Trockne gebracht. Der Rückstand wird in 30 µl Wasser aufge-

nommen und zusammen mit 30 µl einer Lösung von Dansylchlorid (10 mg/ml) in Aceton 20 min lang bei 56 °C verschlossen inkubiert (Kontrolle mit 30 µl Aceton).

Nach dem erneuten Abdampfen der Flüssigkeit (wie oben) wird überschüssiges Dansylchlorid durch Zusatz von 20 µl einer wässerigen Glycylglycylglycin-Lösung (0.1 mol/l) und 10 min Inkubation bei 56 °C abgefangen. Die Proben werden mit 0.58 ml PBS aufgefüllt (Seq) und eingefroren.

7.4.3.3. Behandlung mit Bromcyan

Für jede Spaltung werden 0.25 mmol BrCN in 0.5 ml Ameisensäure eingesetzt. In 20 ml-Plastikscintillationsfläschchen werden die Proben [0.1 ml in PBS (Seq) gelöstes Acetonpulver] und Kontrollen (25 µl einer 1 µmol/l Lösung von Leu- bzw. Met-Enkephalin in Wasser) mit Wasser auf 0.36 ml aufgefüllt, mit 0.34 ml Ameisensäure und weiteren 0.5 ml BrCN-Lösung in Ameisensäure versetzt [Endkonzentration der Säure 70 %(w/w)], licht- und gasdicht verschlossen, gemischt und 48 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Reaktion mit 10 ml kaltem Wasser beendet und die Ansätze lyophilisiert. Die Rückstände werden wiederum in 2 ml Wasser aufgenommen, in 5 ml-Plastikgefäße überführt und erneut gefriergetrocknet. Die neuerlichen Rückstände werden mit 0.1 ml PBS (Seq) aufgenommen und eingefroren.

Die Enkephalinbestimmungen zur Spaltungskontrolle wurden dankenswerterweise von Dr. M.Brandt an Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen 108CC15 (Hamprecht,1974)

ausgeführt (Brandt et al., 1976, Daten nicht gezeigt).

7.4.3.4. Behandlung mit Periodat

Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an eine publizierte Vorschrift (Spiro, 1964).

In einem 12 ml-Schliffzentrifugenglas (NS 14.5) werden 1 ml wässeriger 0.5 mol/l $NaIO_4$-Lösung mit 1 ml 0.15 mol/l NaOAc-Puffer (pH 4.5) gemischt und ein weiterer Milliliter Probe (Acetonpulver in Wasser (Seq)) zugesetzt. Die Mischung wird licht- und luftdicht verschlossen und bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Nach 1 h, 2 h, 5 h, 13 h, 25 h und 49 h werden je 0.4 ml des Reaktionsansatzes entnommen, zur Entfernung aufgetretener Trübungen hochtourig zentrifugiert, der Überstand nach Zusatz von 0.2 ml Ethylenglykol in einem Eppendorff-Reaktionsgefäß über Nacht gegen 2 x 100 ml PBS/Azid bei 4 °C dialysiert (Brand & Stansbury, 1979) und bis zur Verwendung eingefroren.

Analoge Experimente werden auch mit der halben Periodatkonzentration (0.25 mol/l) durchgeführt. Die jeweiligen Kontrollen entsprechen der längsten Inkubationszeit (49 h) und der höchsten Periodatendkonzentration (0.16 mol/l).

7.4.3.5. Bestimmung von organischem Phosphat

Die Überführung von organisch gebundenem Phosphat in Phosphationen durch Oxidation des Kohlenstoffgerüstes mit $Mg(NO_3)_2$ erfolgt nach der Vorschrift von Ames &

Dubin (1960). Der Gehalt an anorganischem Phosphat wird anschließend nach Chen (Chen et al., 1956) mit einer linearen Eichkurve zwischen 0.1 µg und 2 µg Phosphor (als KH_2PO_4) bestimmt.

7.4.3.6. Bestimmung von oxidierbarem Zucker

Die Zuckerbestimmung wird nach einer beschriebenen Methode durchgeführt (Dubois et al., 1956). Dabei werden alle Zucker mit einer freien oder potentiell freien reduzierenden Gruppe erfaßt. Die Eichkurve ist linear zwischen 20 µg und 100 µg Glucose.

7.4.4. Versuche zum Wirkmechanismus

7.4.1.1. Kinetik der Hemmwirkung

Bei diesen Versuchen werden die älteren Zellkulturmethoden in Einzelkulturschalen (Durchmesser 60 mm) angewandt (Traber, 1976). Die Zellen werden nach einmaligem Waschen mit Hepes-Puffer in 3 ml Inkubationspuffer (0.2 mmol/l L-Noradrenalin) auf einem Wasserbad bei 37 °C inkubiert.

Nach 0 bzw. 2 min werden Serum bzw. PBS zugesetzt und die angegebene Zeit weiterinkubiert. Nach Absaugen des Mediums werden die Zellen durch Zusatz von 3 ml 10 %(w/w) TCE aufgebrochen und der Überstand wie beschrieben (Traber, 1976, S. 157) weiterverarbeitet.

In den Versuchen mit Phosphodiesterase-Hemmer sind während der gesamten Inkubation 0.2 mmol/l ZK 62 711 zugegen.

7.4.4.2. Inkubation mit Choleratoxin

Bei diesen Versuchen wird auf die älteren und früher ausführlich beschriebenen (Traber, 1976, S. 156) Zellkulturmethoden in Einzelkulturschalen (Durchmesser 60 mm) zurückgegriffen.

Dem Inkubationsmedium (2.4 ml Hepes-Puffer) werden 10 µl Choleratoxin-Lösung [1.25 mg/ml in Ethanol/Wasser (1 + 9)] zugesetzt (Endkonzentration des Toxins 5 µg/ml) und nach Zugabe von 0.1 ml Serum bzw. PBS die angegebene Zeit auf dem Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Das Medium wird anschließend abgenommen (extrazellulärer cyclo AMP-Gehalt) und die Zellen mit 3 ml 10 %(w/w) TCE geöffnet (intrazellulärer cyclo AMP-Gehalt). Die weitere Aufarbeitung des Überstandes ist beschrieben (Traber, 1976, S. 156).

7.4.4.3. Versuche mit Zellmembranen und -homogenaten

Die Zellhomogenate der Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen (Propst & Hamprecht, 1981) wurden von Dr. F.Propst hergestellt und auch die Hemmversuche dankenswerterweise innerhalb seiner Arbeit durchgeführt.

Die Membranpräparation aus Gliomazellen C6-BU-1 wurden nach einer noch nicht publizierten Vorschrift von

Th.v.Lutterotti hergestellt. Der Proteingehalt der Präparation C 11 (Datum: 13.7.81) beträgt 4 mg/ml.

In einem Gesamtvolumen von 0.25 ml werden 4 µg Membranprotein 10 min lang bei 37 °C gehalten und anschließend 2 min lang gekocht. Der Inkubationsansatz hat folgende Zusammensetzung.

24 mmol/l Tris-HCl-Puffer (pH 7.4 bei 37 °C)
3.13 mmol/l ATP
100 µmol/l GTP
4.9 mmol/l $MgCl_2$
19.5 mmol/l Creatinphosphat
1 mmol/l IBMX
10 µmol/l Isoproterenol
40 µg/ml Creatinkinase

0.1 ml des hochtourigen Zentrifugationsüberstandes werden zur Bestimmung des cyclo AMP-Gehaltes (Kap. 7.3.5.) eingesetzt.

7.4.4.4. Komplexierung der Calciumionen

2 ml Serum werden zweimal je 24 h lang gegen je 1 l wässeriger 5 mmol/l EGTA-Lösung [0.02 %(w/v) NaN_3] im Kühlraum (4 °C) dialysiert (Gesamtverdünnung 1:250000) und anschließend hochtourig (20000 g; 15 min; 4 °C; Sorvall) zentrifugiert. Der geringe Niederschlag wird verworfen.

Für diese Versuche wurde ein calcium- und pantothenfreies Hepes-Inkubationsmedium freundlicherweise von Dr. M.Brandt zur Verfügung gestellt. Es werden sowohl Pipetten als auch Absaugstutzen aus Plastik verwandt. Die Zellen werden dreimal mit Hepes-Medium gewaschen.

7.4.5. Sonstiges

7.4.5.1. Vorinkubation des Serums mit Zellkontakt und Konditionierung

Drei Millionen Gliomazellen C6-BU-1 werden in einem Zellkulturkolben (Kulturfläche 75 cm^2) mit 50 ml 90 %(v/v)DMEM/10 %(v/v)FCS-Medium angesät und 72 h lang kultiviert. Anschließend wird das Medium über dem konfluenten Zellrasen (ca. $6 \cdot 10^7$ Zellen) abgenommen, zentrifugiert und bei 4 °C steril aufbewahrt. Die Zellen werden zweimal mit ca. 30 ml serumfreiem DMEM-Medium gewaschen und danach in 50 ml desselben Mediums 48 h lang weiter gezüchtet. Dieses konditionierte Medium wird aufbewahrt wie oben beschrieben. Die entsprechenden Versuche mit der Leberzellinie BRL-3C4 erfolgen nach gleichem Schema mit dem einen Unterschied, daß die stationären Zellen bereits bei Versuchsbeginn konfluent sind. Im zu konditionierenden Medium wird gegebenenfalls vorher fap-HSA [3 %(w/v)] gelöst und über einen Nalgene-Sterilfilter sterilisiert.

7.4.5.2. Herstellung der Zellextrakte von Leber- und Gliomazellen

Das Anzuchtmedium über dem konfluenten Zellrasen wird abgesaugt. Mit Hilfe einer Blechschere werden die Seitenwände des Gewebekulturkolbens (75 cm^2) entlang der Schweißnaht aufgeschlitzt und so der Boden freigelegt. Ein Gummischaber erleichtert die Zell-

ernte mit insgesamt 3 ml kaltem PBS in einen 50 ml-Zentrifugenbecher. Der Kolbenboden wird mit dem gleichen Volumen PBS nachgewaschen, die Zellen zentrifugiert (1000 g; 5 min; 4 °C; Hettich) und in 2 ml PBS resuspendiert (Proteingehalt: 1.56 +/- 0.08 mg/ml). Nach Überführung der Suspension in ein dickwandiges 12 ml-Zentrifugenglas werden die Zellen dreimal je 30 s lang im Eisbad beschallt (Stufe 2), unterbrochen durch zwei Abkühlungsphasen gleicher Dauer. Die Emulsion wird hochtourig (48000 g; 20 min; 4 °C; Sorvall) zentrifugiert und der klare Überstand eingefroren. Vor dem Einsatz im biologischen Test wird ein Aliquot mit fap-HSA, wie beschrieben (Kap. 7.3.3.), reaktiviert.

7.4.5.3. SDS-Gelchromatografie

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen wird nach einer modifizierten (Walter et al., 1980) Standardvorschrift (Laemmli et al., 1970) durchgeführt.

Die Serumkontrollen werden vor ihrer Denaturierung mit PBS (1 + 49) verdünnt, während die proteasebehandelten Proben unverdünnt eingesetzt werden.

Der Spaltansatz wird unmittelbar vor Gebrauch aus 10 Volumenteilen Mercaptoethanol und 90 Vt Spaltpuffer (0.2 mol/l Tris-HCl-Puffer (pH 6.7 bei 4 °C), 12 mol/l Harnstoff, 6 %(w/v) SDS, 15 %(v/v) Glycerin und eine Spatelspitze Bromphenolblau) gemischt.

Die Proben werden (1 + 1) mit dem Spaltansatz versetzt, 2 min lang im Wasserbad gekocht und auf das Sammelgel [3 %(w/v) Acrylamid, pH 6.8] eines Polyacrylamid--Plattengels [8 %(w/v) Acrylamid, pH 8.9] aufgetragen. Als Elektrodenpuffer wird ein 25 mmol/l Tris-HCl-Puffer (pH 8.7, 192 mmol/l Glycin) mit 0.1 %(w/v) SDS eingesetzt. Die Proben werden 20 min lang bei 75 mA fokussiert, anschließend im Kühlraum (4 ^{o}C) bei 120 mA (maximal 180 V) aufgetrennt. Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgt mit einer Lösung von 1.1 g Coomassie Brillant Blue R 250 in 0.2 l Wasser, 0.2 l Methanol und 40 ml Essigsäure, die Entfärbung mit einer Mischung aus 7 %(v/v) Essigsäure und 5 %(v/v) Methanol in Wasser.

Der Molekulargewichtsstandard enthält Phosphorylase a (95 kg/mol), Ovalbumin (45 kg/mol), Aldolase (40 kg/mol) und Chymotrypsinogen (27 kg/mol).

8. L I T E R A T U R H I N W E I S E

Amano T., Hamprecht B. und Kemper W.:
(1974) High activity of choline acetyltransferase induced in neuroblastoma x glia hybrid cells. Exp.Cell Res. 85, 399-408

Ames B.N. und Dubin D.T.:
(1960) The Role of Polyamines in the Neutralization of Bacteriophage Deoxyribonucleic Acid. J.Biol.Chem. 235, 769-775

Anderson W.B., Gallo M., Wilson J., Lovelace E. und Pastan I.:
(1979a) Effect of epidermal growth factor on prostaglandin E_1-stimulated accumulation of cyclic AMP in fibroblastic cells. FEBS Lett. 102, 329-332

Anderson W., Jaworski C. und Pinkett M.O.:
(1979b) Protease Regulation of Hormonal Responsivness in Cultured Fibroblasts. in "Proteases and Hormones" M.K. Agarval (Hrsg.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press Amsterdam, New York, Oxford

Anderson W.B., Wilson J., Rechler M.M. und Nissley S.P.:
(1979c) Effect of multiplication stimulating activity (MSA) on intracellular cAMP levels and adenylate cyclase activity in chick embryo fibroblasts. Exp.Cell Res. 120, 47-53

Arenander A.T. und deVellis J.:
(1980) Glial-released proteins in clonal cultures and their modulation by hydrocortisone. Brain Res. 200, 401-419

Bakardijeva A., Galla H.J. und Helmreich E.J.M.:
(1979) Modulation of the ß-Receptor Adenylate Cyclase Interactions in Cultured Chang Liver Cells by Phospholipid Enrichment. Biochemistry 18, 3016-3023

Bartholow L.C. und Geyer R.P.:
(1982) Sterol Efflux from Mammalian Cells Induced by Human Serum Albumin-Phospholipid Complexes. J.Biol.Chem. 257, 3126-3130

Bashor M.M. und Saier Jr. M.H.:
(1976) Inhibiton by serum of hormone-stimulated Adenylate cyclase in cultured cells. Fed.Proc. 35, 1715

Bataille D., Freychet P. und Rosselin G.:
(1974) Interactions of Glucagon, Gut Glucagon, Vasoactive Intestinal Polypeptide and Secretin with Liver and Fat Cell Plasma Membranes: Binding to Specifie Sites and Stimulation of Adenylate Cyclase. Endocrinology 95, 713-721

Benda P., Lightbody J., Sato G., Levine L. und Sweet W.:
(1968) Differentiated Rat Glial Cell Strain in Tissue Culture. Science 161, 370-371

Benveniste J., Henson P.M. und Cochrane C.G.:
(1972) Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets: The role of IgE, basophils and platelet-activating factor. J.Exp.Med. 136, 1356-1377

Benveniste J.:
(1974) Platelet-activating factor, a new mediator of anaphylaxis and immune complex deposition from rabbit and human basophils. Nature 249, 581-582

Benveniste J., Le Couédic J.P., Polonsky J. und Tencé M.:
(1977) Structural analysis of purified platelet-activating factor by lipases. Nature 269, 170-171

Benveniste J., Tencé M., Bidault J., Boullet C., Varenne P. und Polonsky J.:
(1979) Semi-synthèse et structure proposée du facteur activant les plaquettes (P.A.F.): PAF-acether, un alkyl ether analogue de la lysophophatidylcholine. C.R.Acad.Sci. Paris (D) 289, 1017-1021

Benveniste J.:
(1980) Platelet activating factor (PAF-acether). Adv.Allerg.Clin.Immunol. 1980, 195-202

Bernardi G.:
(1973) Chromatography of Proteins on Hydroxyapatit. in "Methods in Enzymology" Hrsg.: C.H.W. Hirs und S.N. Timasheff 27, 471-479 Academic Press, New York und London

Biorad
(1980) Product Information.
Richmond, Großbritannien

Blank M.L., Snyder F., Byers L.W., Brooks B. und Muirhead E.E.:
(1979) Antihypertensive activity of an alkyl ether analogue of phosphatidylcholine.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 90, 1194-1200

Bottenstein J.E. und Sato G.H.:
(1979) Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76, 514-517

Bradford M.M.:
(1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.
Anal.Biochem. 72, 248-254

Brand P.H. und Stansbury R.:
(1979) Improved Microdialysis Technique.
Anal.Biochem. 94, 109-111

Brandt M.:
(1980) Studien zur Wirkungsweise von Opioiden an einem neuronalen Modellsystem: Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen.
Dissertation, Universität München

Brandt M., Buchen C. und Hamprecht B.:
(1980) Relationship Between the Actions of Calcium Ions, Opioids and Prostaglandin E_1 on the Level of Cyclic AMP in Neuroblastoma x Glioma Hybrid Cells.
J.Neurochem. 34, 643-651

Brandt M., Gullis R.J., Fischer K., Buchen C., Hamprecht B., Moroder L. und Wünsch E.:
(1976) Enkephalin regulates the levels of cyclic nucleotides in neuroblastoma x glioma hybrid cells.
Nature 262, 311-313

Brown J.R.:
(1977) Albumin - Structure, Function und Uses.
S. 27-51
(Hrsg.: V.M. Rosenoer, M. Oratz und M.A. Rothschild)
Pergamon Press, New York, London

Brunner G., Lang K., Wolfe R.A., McClure D.B. und Sato G.:
(1982) Selective cell culture of brain cells by serum-free hormone-supplemented media: a comparative morphological study.
Develop.Brain Res. 2, 563-575

Butcher R.W. und Sutherland E.W.:
(1962) Adenosine 3',5'-Phosphate in Biological Materials.
J.Biol.Chem. 237, 1244-1250

Cantley Jr. L.C., Josephson L., Warner R., Yanagisawa M., Lechêne C. und Guidotti G.:
(1977) Vanadate Is a Potent (Na,K)-ATPase Inhibitor Found in ATP derived from Muscle. J.Biol.Chem. 252, 7421-7423

Case R.M., Laundy T.J. und Scratcherd T.:
(1969) Adenosine 3',5'-monophosphate (cyclic AMP) as intracellular mediator of action of secretin on exocrine pancreas. J.Physiol.Lond. 204, 45-53

Cassel D. und Pfeuffer T.:
(1978) Mechanism of cholera toxin action: Covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylate cyclase system. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75, 2669-2673

Cassel D. und Selinger Z.:
(1977) Mechanism of adenylate cyclase activation by cholera toxin: Inhibition of GTP hydrolysis at the regulatory site. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 74, 3307-3311

Cassel D. und Selinger Z.:
(1978) Mechanism of adenylate cyclase activation through the ß-adrenergic receptor: Catecholamine-induced displacement of bound GDP by GTP. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75, 4155-4159

Chen P.S., Toribara T.Y. und Warner H.:
(1956) Microdetermination of Phosphorus. Anal.Chem. 28, 1756-1758

Chen R.F.:
(1967) Removal of Fatty Acids from Serum Albumin by Charcoal Treatment.
J.Biol.Chem. 242, 173-181

Chignard M., Tencé M., Le Couédic J.P.,Vargaftig B.B. und Benveniste J.:
(1979) Is platelet-activating factor (PAF) the mediator for the third pathway of platelet aggregation?
Fed.Proc. 38, 1342

Citri Y. und Schramm M.:
(1980) Resolution, reconstitution and kinetics of the primary action of a hormone receptor.
Nature 287, 297-300

Clark J.M. und Switzer R.L.:
(1977) Experimental Biochemistry.
2. Auflage, S. 321
Freeman & Company, San Francisco, USA

Clark R.B. und Perkins J.P.:
(1971) Regulation of Adenosine 3':5'-Cyclic Monophosphate Concentration in Cultured Human Astrocytoma Cells by Catecholamines and Histamine.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 68, 2757-2760

Clark R.B., Gross R., Su Y.-F. und Perkins J.P.:
(1974) Regulation of Adenosine 3':5'-Monophosphate Content in Human Astrocytoma Cells by Adenosine and the Adenine Nucleotides.
J.Biol.Chem. 249, 5296-5303

Clark R.B., Salmon D.M. und Honeyman T.W.:
(1980) Phosphatidic Acid Inhibition of PGE_1-
-Stimulated cAMP Accumulation in WI-38
Fibroblasts: Similarities with Carbachol
Inhibition.
J.Cyclic Nucl.Res. 6, 37-49

Cohn E.J., Strong L.E., Hughes Jr. W.L., Mulford D.J.,
Ashworth J.N., Melin M. und Taylor H.L.:
(1946) Preparation and Properties of Serum and
Plasma Proteins.
IV. A system for the Separation into
Fractions of the Protein and Lipoprotein
Components of Biological Tissue and Fluids.
J.Amer.Chem.Soc. 68, 459-475

Cohn E.J., Hughes Jr. J.H. und Weare J.H.:
(1947) Preparations and Properties of Serum and
Plasma Proteins.
XIII. Crystallization of Serum Albumins from
Ethanol-Water Mixtures.
J.Amer.Chem.Soc. 69, 1753-1761

Coon H.D.:
(1968) Clonal Culture of Differentiated Rat Liver
Cells.
J.Cell Biol. 39, 29A

Cooper D.M.F. und Rodbell M.:
(1979) ADP is a potent inhibitor of human platelet
plasma membrane adenylate cyclase.
Nature 282, 517-518

Cuatrecasas P.:
(1973) Gangliosides and Membrane Receptors for Cholera Toxin.
Biochemistry 12, 3558-3566

Cusack N.J.:
(1980) Platelet-activating factor.
Nature 285, 193

Darfler F., Hughes R.J. und Insel P.A.:
(1981) Characterization of Serum-induced Alterations in the Cyclic AMP Pathway in S 49 Lymphoma Cells.
J.Biol.Chem. 256, 8422-8428

de Haas G.H., Bonsen P.P.M. Pieterson W.A. und van Deenen L.L.M.:
(1971) Studies on Phospholipase A and its Zymogen from Porcine Pancreas.
Biochim.Biophys.Acta 239, 252-266

Demopoulos C.A., Pinckard R.N. und Hanahan D.J.:
(1979) Platelet-activating factor.
J.Biol.Chem. 254, 9355-9358

Dibner M.D. und Insel. P.A.:
(1981) Down regulation of the beta-adrenergic receptor/cyclic AMP system in C6 glioma cells by growth in serum.
Fed.Proc. 40, 254 (100)

Dibner M.D., Wolfle R.A. und Insel P.A.:
(1981) Replacement of serum with a defined medium increases ß-adrenergic receptor number in cultured glioma cells.
Exp.Cell Res. 131, 424-427

Drainas D., Harvey E., Lawrence A.L. und Thomas A.:
(1981) Mechanism for Albumin-Mediated Membrane Damage.
Eur.J.Biochem. 114, 239-245

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. und Smith F.:
(1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances.
Anal.Chem. 28, 350-356

Eimerl S., Neufeld G., Korner M. und Schramm M.:
(1980) Functional implantation of a solubilized ß-adrenergic receptor in the membrane of a cell.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77, 706-764

Enomoto K. und Gill D.M.:
(1980) Cholera Toxin Activation of Adenylate Cyclase.
J.Biol.Chem. 255, 1252-1258

Fan K. und Uzman B.G.:
(1977) Rat glioma cells (C_6) cultured in serum-free defined medium.
Exp.Cell Res. 106, 397-401

Field M.:
(1971) Intestinal Secretion: Effect of Cyclic AMP and Its Role in Cholera.
New Engl.J.Med. 284, 1137-1144

Fontaine R.N., Harris R.A. und Schroeder F.:
(1979) Neuronal Membrane Lipid Asymmetry.
Life Sci. 24, 395-400

Fontaine R.N., Harris R.A. und Schroeder F.:
(1980) Aminophospholipid Asymmetry in Murine Synaptosomal Plasma Membrane.
J.Neurochem. 34, 269-277

Frenkel E.J., Roelofsen B., Brodbeck U., van Deenen L.L.M. und Ott P.:
(1980) Lipid-Protein Interactions in Human Erythocyte--Membrane Acetylcholinesterase.
Eur.J.Biochem. 109, 377-382

Fukushima D., Yokoyama S., Kezdy F.J. und Kaiser E.T.:
(1981) Binding of amphiphilic peptides to phospholipid/cholesterol unilamellar vesicles:
A Model for protein-cholesterol interaction.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 78, 2732-2736

Galla H.-J. und Sackmann E.:
(1974) Lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes: use of pyrene excimers as optical probes.
Biochim.Biophys.Acta 339, 103-115

Gerbitz K.-D., Kolb H.J. und Wieland O.H.:
(1977) Human Alkaline Phosphatases:
I. Purification and Some Structural Properties of the Enzyme from Human Liver.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 358, 435-446

Gerbitz K.-D.:
(1977) Human Alkaline Phosphatases:
II. Metalloenzyme Properties of the Enzyme from Human Liver.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 358, 1491-1497

Glaser T:
(1981) Studien zu Gehalt und Regulation von Opioiden an permanenten Zellkulturen des Nervensystems.
Dissertation, Universität München

Glaser T., Hübner K. und Hamprecht B.:
(1982) Neuroblastoma x Glioma Hybrid Cells Synthesize Enkephalin-Like Opioid Peptides.
J.Neurochem. 39, 59-69

Goodman D.S.:
(1958) The Interaction of Human Serum Albumin with long-chain Fatty Acid Anions.
J.Amer.Chem.Soc. 80, 3892-3898

Gordensky S.E. und Marinetti G.V.:
(1973) The asymmetric arrangement of phospholipids in the human erythrocyte membrane.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 50, 1027-1031

Gray W.R. und Hartley B.S.:
(1963) The Structure of a Chymotryptic Peptide from Pseudomonas Cytochrome c-551. Biochem.J. 89, 379-380

Hamprecht B.:
(1974a) Cell Cultures as Model Systems for Studying the Biochemistry of Differentiated Functions of Nerve Cells. in "Biochemistry of Sensory Functions" (Hrsg.: L.Jaenicke) S. 391-423. Springer, Berlin

Hamprecht B.:
(1974b) Cell Cultures as Model Systems for Studying the Biochemistry of Differentiated Functions of Nerve Cells. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 355, 109-110

Hamprecht B.:
(1977) Structural, Electrophysiological, Biochemical, and Pharmacological Properties of Neuroblastoma x Glioma Cell Hybrids in Cell-Culture. Internat.Rev.Cytol. 49, 99-170

Hamprecht B. und Schultz J.:
(1973) Influence of Noradrenalin, Prostaglandin E_1 and Inhibitors of Phosphodiesterase Activity on Levels of the Cyclic Adenosine 3':5'--monophosphate in Somatic Cell Hybrids. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 354, 1633-1641

Hanahan D.J., Demopoulos C.A., Liehr J. und Pinckard R.N.:
(1980) Identification of Platelet Activating Factor Isolated from Rabbit Basophils as Acetyl Glyceryl Ether Phosphorylcholine. J.Biol.Chem. 255, 5514-5516

Haynes Jr. R.C.:
(1958) The Activation of Adrenal Phosphorylase by the Adrenocorticotropic Hormone. J.Biol.Chem. 233, 1220-1222

Henis Y.I., Ramon G. und Felder S.:
(1982) Lateral Mobility of Phospholipids in Turkey Erythrocytes: Implications for adenylate cyclase. J.Biol.Chem. 257, 1407-1411

Heumann R.:
(1978) Herstellung und Charakterisierung von polyploiden Gliomazellen und von zugleich cholinerg-adrenergen Hybridzellen. Dissertation, Technische Universität München

Heumann R., Reiser G., van Calker D. und Hamprecht B.:
(1982) Polyploid rat glioma cells. Exp.Cell Res. 139, 117-126

Himmelhoch S.R. und Peterson E.A.:
(1966) Experimental Problems in the Use of Commercially Prepared DEAE-Celluloses for Protein Chromatography. Anal.Biochem. 17, 383-389

Hirata F., Strittmatter W.J. und Axelrod J.:
(1979) ß-adrenergic receptor agonists increase phospholipid methylation, membrane fluidity, and ß-adrenergic receptor-adenylate cyclase coupling. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76, 368-372

Hirsch J. und Ahrens E.H. Jr.:
(1958) The Separation of Complex Lipid Mixtures by the Use of Silicic Acid Chromatography. J.Biol.Chem. 233, 311-320

Hjelle J.T., Baird-Lambert J., Cardinale G., Spector S. und Udenfriend S.:
(1978) Isolated microvessels: The blood-brain barrier in vitro. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75, 4544-4548

Howlett A.C., Sternweis P.C., Macik B.A., van Arsdale P.M. und Gilman A.G.:
(1979) Reconstitution of Catecholamine-sensitive Adenylate Cyclase. J.Biol.Chem. 254, 2287-2295

Hsu Ch.-Y. und Brooker G.
(1977) Characteristics of Serum Inhibition of Epinephrine-stimulated Cyclic AMP Accumulation in a Rat Glioma Cell Line (C6-2B). Fed.Proc. 36, 688

Humbel R.E.:
(1978) Insulin-like growth factors. Serminarvortrag - Universtität München

Kates M.:
(1972a) Techniques of Lipidology, S. 400-401. North-Holland Publishing Company, Amsterdam

Kates M.:
(1972b) Techniques of Lipidology, S. 558-559. North-Holland Publishing Company, Amsterdam

Klagsbrun M.:
(1980) Bovine Colostrum supports the serum-free proliferation of epithelial cells but not of fibroblasts in long-term culture. J.Cell Biol. 84, 808-814

Koschel K.:
(1977) Der antagonistische Effekt eines Serumfaktors gegenüber der Catecholamin-induzierten ß-Rezeptorantwort in Rattenglioma-C6-Zellen. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 358, 265

Koschel K.:
(1980) A Hormone-independent Rise of Adenosine 3',5'-Monophosphate Desensitizes Coupling of ß-Adrenergic Receptors to Adenylate Cyclase in Rat Glioma C6-Cells. Eur.J.Biochem. 108, 163-169

Laemmli U.K.:
(1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T 4. Nature 227, 680-685

Leon A., Benvegnu D., Toffano G., Orlando P. und Massari P.:
(1978) Effect of brain cortex phospholipids on adenylate-cyclase activity of mouse brain. J.Neurochem. 30, 23-26

Levin Ö.:
(1962) Column Chromatography of Proteins: Calcium Phosphate. in "Methods in Enzymology" 5, 27-32 (Hrsg. S.P. Colowick und N.O. Kaplan) Academic Press, New York, USA

Levitzki A. und Helmreich E.J.M.:
(1979) Hormone-receptor-adenylate cyclase interactions. FEBS Lett. 10, 213-219

Liebermann M.A., Rothenberg P., Raben D.M. und Glaser L.:
(1980) Effect of 3T3 Plasma Membranes on Cells Exposed to Epidermal Growth Factor. Biochem.Biophys.Res.Commun. 92, 696-702

Liebkalns V.A., Icard C., Yates A.J., Thompson D.K. und Hart R.W.:
(1981) Effects of Cell Density on Lipids of Human Glioma and Fetal Neural Cells. J.Neurochem. 36, 1959-1965

Limbird L.E., Gill D.M. und Lefkowitz R.J.:
(1980) Agonist-promoted coupling of the ß-adrenergic receptor with the guanine nucleotide regulatory protein of the adenylate cyclase system. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77, 775-779

Londos C., Salomon Y., Lin M.C., Harwood J.P., Schramm M., Wolff J. und Rodbell M.:
(1974) 5'-Guanylylimidodiphosphate, A Potent Activator of Adenylate Cyclase Systems in Eukaryotic Cells. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 71, 3087-3090

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. und Randall R.J.:
(1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J.Biol.Chem. 193, 265-275

Macfarlane M.G. und Knight B.C.J.G.:
(1941) The biochemistry of bacterial toxins.
Biochem.J. 35, 884-902

Maclouf J., Kindahl H., Granstrøm E. und Samuelsson B.:
(1980) Interactions of Prostaglandin H_2 and Thromboxane A_2 with Human Serum Albumin.
Eur.J.Biochem. 109, 561-566

Marinetti G.V. und Stotz E.:
(1956) Chromatography of phosphatides on silicic acid impregnated paper.
Biochim.Biophys.Acta 21, 168-170

McMenamy P.H. und Lee Y.:
(1967) Microheterogeneity in Albumin: A Contaminant.
Arch.Biochem.Biophys. 122, 635-643

Meisner H.:
(1980) Binding of Anionic Ligands to Peptic Fragments of Bovine Serum Albumin.
Mol.Pharmacol. 18, 224-229

Moolenaar W.H., de Laat S.W. und van der Saag P.T.:
(1979) Serum triggers a sequence of rapid ion conductance changes in quiescent neuroblastoma cells.
Nature 279, 721-723

Morris S.A. und Makman M.H.:
(1976) Cell Density and Receptor-Adenylate Cyclase Relationships in C6 Astrocytoma Cells.
Mol.Pharmacol. 12, 362-372

Moss J. und Vaughan M.:
(1978) Isolation of an avian erythrocyte protein possessing ADP-ribosyltransferase activity and capable of activating adenylate cyclase.
Proc.Natl.Acad.Sci. 75, 3621-3624

Moss J. und Vaughan M.:
(1979) Activation of adenylate cyclase by choleragen.
Ann.Rev.Biochem. 48, 581-600
(Hrsg.: E.E. Snell)

Nelson G.J.:
(1967) The Phospholipid Composition of Plasma in Various Mammalian Species.
Lipids 2, 323-328

Odell G.B., Cohen S.N. und Kelly P.C.:
(1969) Studies in kernicterus.
II. The determination of the saturation of serum albumin with bilirubin.
J.Pediatr. 74, 214-230

Ottolenghi A.C.:
(1969) Phospholipase C.
in "Methods in Enzymology" 14, 188-197
(Hrsg.: J.M. Lowenstein)
Academic Press, N.Y., USA

Pastan I.H., Johnson G.S. und Anderson W.B.:
(1975) Role of cyclic nucleotides in growth control.
Ann.Rev.Biochem. 44, 491-522
(Hrsg.: E.E. Snell)

Pecker F. und Hanoune J.:
(1977a) Activation of Epinephrine-sensitive Adenylate Cyclase in Rat Liver by Cytosolic Protein--Nucleotide Complex.
J.Biol.Chem. 252, 2784-2786

Pecker F. und Hanoune J.:
(1977b) Uncoupled ß-adrenergic receptors and adenylate cyclase can be recoupled by a GTP-dependent cytosolic factor.
FEBS Lett. 83, 93-98

Perkins J.P.:
(1973) Adenyl Cyclase.
Adv.Cycl.Nucl.Res. 3, 1-64
(Hrsg.: P. Greengard und G.A. Robison)

Pfeuffer T.:
(1977) GTP-binding Proteins in Membranes and the Control of Adenylate Cyclase Activity.
J.Biol.Chem. 252, 7224-7234

Pfeuffer T.:
(1979) Guanine nucleotide-controlled interactions between components of adenylate cyclase.
FEBS Lett. 101, 85-89

Pharmacia
(1981) Sephadex Gel Filtration, Theory and Praxis.
Firmenschrift PHARMACIA
Uppsala, Schweden

Posternak T.:
(1971) Formation and Metabolism of cyclic AMP.
in "Cyclic AMP", S. 73-90
Hrsg.: G.A. Robison, R.W. Butcher und
E.W. Sutherland
Academic Press, New York und London

Posternak T.:
(1971) Glucagon und Insulin.
in "Cyclic AMP", S. 232-287
Hrsg.: G.A. Robison, R.W. Butcher und
E.W. Sutherland
Academic Press, New York und London

Propst F.:
(1980) Unveröffentlichte Ergebnisse.

Propst F.:
(1981) Untersuchungen zur Regulation der cyclo
AMP-Synthese an permanenten Zellkulturen
des Nervensystems.
Dissertation, Universität Innsbruck

Propst F. und Hamprecht B.:
(1981) Opioids, Noradrenaline and GTP Analogs Inhibit Cholera Toxin Activated Adenylate Cyclase
in Neuroblastoma x Glioma Hybrid Cells.
J.Neurochem. 36, 580-588

Propst F., van Calker D., Moroder L., Wünsch E. und Hamprecht B.:
(1979) The influence of gastrointestinal hormones on the level of cyclic AMP in neuroblastoma x glioma hybrid cells and in cells of primary culture of perinatal mouse brain. in "Hormone Receptors in Digestion and Nutrition" (Hrsg.: G. Rosselin, P. Fromageot und S. Bonfils) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam

Rall T.W. und Sutherland E.W.:
(1958) Formation of a cyclic adenine ribonnucleotide by tissue particles. J.Biol.Chem. 232, 1065-1076

Rasenick M.M. und Bitensky M.W.:
(1980) Partial purification and characterization of a macromolecule which enhances fluoride activation of adenylate cyclase. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77, 4628-4632

Renooij W. und vanGolde L.M.G.:
(1976) The exchange of phospholipids between rat erythrocytes and plasma, and the translocation of phosphatidylcholine across the red cell membrane, are temperature dependent processes. FEBS Lett. 71, 321-324

Rethy A., Thomasi V., Trevisani A. und Barnabei O.:
(1972) The Role of Phosphatidylserine in the Hormonal Control of Adenylate Cyclase of Rat Liver Plasma Membranes.
Biochim.Biophys.Acta 290, 58-69

Robison G.A., Butcher R.W. und Sutherland E.W.:
(1968) Cyclic AMP
Ann.Rev.Biochem. 37, 149-174

Robison G., Butcher R.W. und Sutherland E.W.:
(1971) Cyclic AMP
Academic Press, New York und London

Rouser G., Kritchevsky G. und Yamamoto A.:
(1976) Column chromatography and associated procedures for separation and determination of phosphatides and glycolipids.
in "Lipid Chromatographic Analysis"
2. ed.: (Hrsg.: G.V. Marinetti) 3, 713-776.
Dekker Inc., New York, USA

Rudman D., Treadwell P., Vogler W.R., Hovard C.H. und Hollins B.:
(1972) An abnormal orosomucoid in the plasma of patients with neoplastic diseases.
Cancer Res. 32, 1951-1959

Sattin A. und Rall T.W.:
(1970) Effect of adenosine and adenine nucleotides on cyclic adenosine 3',5'-Phosphate content of guinea pig cerebral cortex slices.
Mol.Pharm. 6, 13-

Shier W.T., Baldwin J.M., Nilson-Hamilton M., Hamilton R.T. und Thanassi N.M.:
(1976) Regulation of guanylate and adenylate cyclase activities by lysolecithin. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 73, 1586-1590

Spector A.A., John K. und Fletcher J.E.:
(1969) Binding of long-chain fatty acids to bovine serum albumin. J.Lipid Res. 10, 56-67

Spector T.:
(1980) Charcoal-Facilitated Dialysis. Anal.Biochem. 103, 313-315

Spiro R.G.:
(1964) Periodate Oxidation of the Glycoprotein Fetuin. J.Biol.Chem. 239, 567-573

Sutherland E.W. und Rall T.W.:
(1958) Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. J.Biol.Chem. 232, 1077-1091

Schiltz E., Schnackerz K.D. und Gracy R.W.:
(1977) Comparison of Ninhydrin, Fluorescamine, and o-Phthaldialdehyde for the Detection of Amino Acids and Peptides and Their Effects of the Recovery and Composition of Peptides from Thin-Layer Fingerprints. Anal.Biochem. 79, 33-41

Schimmel R.J., Honeyman T.W., McMahon K.K., Serio R. und Clark R.B.:
(1980) Inhibition of Cyclic AMP Accumulation in Hamster Adipocytes with Phosphatidic Acid: Differences and Similarities with Alpha Adrenergic Effects.
J.Cyclic Nucl.Res. 6, 437-449

Schramm G. und Mohr E.:
(1959) Purification of Neuraminidase from Vibrio cholerae.
Nature 183, 1677-1678

Schutta H.S. und Johnson L.:
(1967) Bilirubin encephalopathy in the GUNN rat, a fine-structure study of the cerebral cortex.
J.Neuropathol.Exp.Neurol. 26, 377-388

Schwick H.G., Heide K. und Haupt M.:
(1977) Blood Glycoproteins (Section 1).
in "The Glycoconjugates"
Vol. 1: Mammalian Glycoproteins and Glycolipids, S. 261-321
Hrsg.: M.I. Horowitz und W.Pigman
Academic Press, New York, San Francisco, London

Strewler G.J. und Manganiello V.C.:
(1979) Purification and Characterization of Phosphodiesterase Activator from Kidney.
J.Biol.Chem. 254, 11891-11898

Tallmann J.F. und Brady R.O.:
(1972) Neuraminidase (Sialidase) from Rat Heart. in "Methods in Enzymology" Hrsg.: V. Ginsburg 28, 825-829 Academic Press,New York und London

Tell G.P.E., Cuatrecasas P., van Wyk J.J. und Hintz R.L.:
(1973) Somatomedin: Inhibition of Adenylate Cyclase Activity in Subcellular Membranes of Various Tissues. Science 180, 312-315

Tencé M., Polonsky J., Le Couédic J.-P. und Benveniste J.:
(1980) Release, purification, and characterization of platelet-activating factor (PAF). Biochimie 62, 251-259

Teresi J.D. und Luck J.M.:
(1952) The combination of organic anions with serum albumin. J.Biol.Chem. 194, 823-834

Tolkowsky A.M. und Levitzki A.:
(1978) Mode of Coupling between the ß-Adrenergic Receptor and Adenylate Cyclase in Turkey Erythrocytes. Biochemistry 17, 3795-3810

Tomasi M., Roda L.G., Ausiello C., D'Agnolo G., Venerando B., Ghidoni R., Sonnino S. und Tettamanti G.:
(1980) Interaction of G_{M1} Ganglioside with Bovine Serum Albumin. Formation and Isolation of Multiple Complexes. Eur.J.Biochem. 111, 315-324

Traber J.:
(1976) Untersuchungen zur Wirkung von Opiaten und Neurohormonen an klonalen permanenten Zellkulturen des Nervensystems. Dissertation, Universität München.

Travis J., Bowen J., Tewksbury D., Johnson D. und Pannell R.:
(1976) Isolation of Albumin from Whole Human Plasma and Fractionation of Albumin-Depleted Plasma. Biochem.J. 157, 301-306

van Calker D.:
(1977) Untersuchungen zur Charakterisierung und Fraktionierung von Primärkulturen des Zentralnervensystems. Dissertation, Universität München

van Calker D. und Hamprecht B.:
(1980) Effects of Neurohormones on Glial-Cells. Adv.Cell.Neurobiol. 1, 31-67 (Hrsg.: S. Federoff und L. Hertz)

van Calker D., Müller M. und Hamprecht B.:
(1977) Serum contains a Heat-Stable Factor, which Inhibits the Accumulation of Cyclic AMP in Cultured Cells.
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 358, 1188

van Calker D., Müller M. und Hamprecht B.:
(1979) Receptors Regulating the Level of Cyclic AMP in Primary Cultures of Perinatal Mouse Brain.
in "Neural Growth and Differentation"
Hrsg.: E. Meisami und M.A.B. Brazier
Raven Press, New York, USA

van Heyningen W.E.:
(1974) Gangliosides as membrane receptors for tetanus toxin, cholera toxin and serotonin.
Nature 249, 415-417

Varon S. und Adler R.:
(1982) Trophic and specifying factors directed to neuronal cells.
Adv.Cell.Neurobiol. 2, 115-163

Virchow R.:
(1847) Die Pathologischen Pigmente.
Virchows Arch.Pathol.Anat.Physiol. 1, 379

Wagner K.:
(1978) Untersuchungen zur Regulation des intrazellulären 3':5'-cyclischen Adenosinmonophosphates in Gliomazellen durch einen Serumfaktor.
Diplomarbeit, Universität München

Wagner K.:
(1981) Klammerfreies Vakuumfiltrationssystem mit automatischer Filterbelüftung. Patentanmeldung P 31 39 571.6 vom 5. Okt. 1981

Wagner K., Dietrich H. und Hamprecht B.:
(1981) Characterization of an activity in serum which inhibits the hormonally stimulated accumulation of cyclic AMP in cell cultures. Regards sur la Biochimie 3, 92

Wagner K. und Feineis H.:
(1982) Klammerfreies Vakuumfiltrationsgerät mit automatischer Filterbelüftung für die Radioanalytik. Fresenius Z.Anal.Chem. 311, 366-367

Walter U., Kanof Ph., Schulman H. und Greengard P.:
(1978) Adenosine 3':5'-Monophosphate Receptor Proteins in Mammalian Brain. J.Biol.Chem. 253, 6275-6280

Walter U., Miller P., Wilson F., Merkes D. und Greengard P.:
(1980) Immunological Distinction between Guanosine 3':5'-Monophosphate-dependent and Adenosine 3':5'-Monophosphate-dependent Protein Kinases. J.Biol.Chem. 255, 3757-3762

Walter U., Uno I., Liu A.Y.-C. und Greengard P.:
(1977) Identification, Characterization, and Quantitative Measurement of Cyclic AMP Receptor Proteins in Cytosol of Various Tissues Using a Photoaffinity Ligand. J.Biol.Chem. 252, 6494-6500

Whatman
(1978) Laboratory Manual. Firmenschrift Whatman, Maidstone, G.B.

White A.A. und Karr D.B.:
(1980) Inhibition of soluble guanylate cyclase by bovine serum albumin. J.Cycl.Nucl.Res. 6, 271-282

Zick Y., Cesla R. und Shaltiel Sh.:
(1982) Exposure of Thymocytes to a low Temperature (4 ^{o}C) Inhibits the Onset of Their Hormone--induced Cellular Refractoriness. J.Biol.Chem. 257, 4253-4259

Zwiller J., Ciesielski-Treska J. und Mandel P.:
(1976) Effect of lysolecithin on guanylate and adenylate cyclase activities in neuroblastoma cells in culture. FEBS Lett. 69, 286-290

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernd Hamprecht am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried begonnen (Sept. 1978 - Juli 1979) und am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Würzburg fortgeführt (Aug. 1979 - März 1982).

Herrn Prof. Dr. B. Hamprecht und seinem gesamten Arbeitskreis danke ich für stets kritisches Interesse an dieser Arbeit und viele anregende Diskussionen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Doris Ollig (Sept. 1978 - Juli 1979), Frau Heidrun Dietrich (Aug. 1979 - Sept. 1981) und Frl. Gudrun Stumpf (Okt. 1981 - März 1982) für die ausdauernde und engagierte technische Hilfe, die sie dieser Arbeit in jeder Phase angedeihen ließen, sowie bei Frau Petra Jacobs, die die Reinschrift des Manuskripts anfertigte.
Ferner gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Guido Hartmann, der diese Arbeit vor der Fakultät vertrat.

Ohne die finanzielle und materielle Unterstützung der Max-Planck-Gesellschaft wie später auch der Universität Würzburg wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Durch ihr unerschöpfliches Verständnis hat meine Frau viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich bin ihr dafür sehr dankbar.

L E B E N S L A U F

persönliche Daten

10. Sept. 1952	Geburt in München als zweites von sechs Kindern Eltern: Theresia Wagner, geb. Kratzer Dipl.-Math. Richard Wagner
Febr. 1980	Eheschließung mit Waltraud Machnik
Aug. 1980	Geburt unserer Tochter Angela
Dez. 1981	Geburt unseres Sohnes Benedikt

Ausbildung

Sept.1958-Juli 1962	Besuch der "Volksschule an der Rotbuchenstraße" in München
Sept.1962-Juli 1971	Besuch des neusprachlichen Albert--Einstein-Gymnasiums in München
Juni 1971	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
Nov.1972-Juli 1977	Studium der Chemie und Biochemie an der Ludwig-Maximilians--Universität München
April 1975	Ablegung der Diplom-Vorprüfung
Juli 1977	Ablegung der Diplom-Hauptprüfung

Sept.1977-Aug.1978	Anfertigung der Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried
Sept.1978-Juli 1979	Beginn der vorliegenden Dissertation am gleichen Institut in der Arbeitsgruppe von Prof.Dr. B.Hamprecht
Juli 1979-März 1982	Fortführung der Dissertation am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Würzburg in der gleichen Arbeitsgruppe.

bisherige berufliche Tätigkeiten

Juli 1971-März 1972	Wehrersatzdienst in den Medizinischen Universitätskliniken l.d.I., München, als Pfleger
April 1972-Okt.1972	Wehrersatzdienst in der Chirurgischen Universitätsklinik l.d.I., München, als Stationspfleger
Sept.1977-Okt.1979	Stipendiat der Max-Planck-Gesellschaft
Nov.1979-Juli 1982	wiss. Mitarbeiter am Physiologisch--Chemischen Institut der Universität Würzburg (Praktikum für Mediziner)
seit Aug. 1982	Leiter des klinisch-chemischen Zentrallabors im Städt. Krankenhaus Lörrach

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80